

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA**

**AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE TRIAGEM PARA DETERMINAÇÃO DE  
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRODUTOS NATURAIS**

**Dissertação apresentada ao Programa  
de Pós-Graduação em Farmácia como  
requisito parcial à obtenção do grau de  
Mestre em Farmácia.**

**Orientador: Prof. Dr. Artur Smânia Jr**

**CLEIDSON VALGAS**

**FLORIANÓPOLIS  
2002**

**“AVALIAÇÃO DE MÉTODOS DE TRIAGEM PARA  
DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE  
PRODUTOS NATURAIS”**

**POR**

**CLEIDSON VALGAS**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo Orientador e  
membros da Banca Examinadora,  
composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

---

**Artur Smânia Júnior** (MIP/CCB/UFSC – Membro Titular)

---

**Adair Roberto Soares dos Santos** (UNISUL/CCBS – Membro Titular)

---

**Moacir Geraldo Pizzolatti** (QMC/CFM/UFSC – Membro Titular)

**Profª . Dra. Miriam de Barcellos Falkenberg**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC**

**Florianópolis, 22 de fevereiro de 2002.**

*A minha querida esposa  
Katiany e a minha adorável filha  
Camila pelo amor oferecido e pela  
compreensão de todas as minhas  
ausências.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A Deus pela saúde, força de vontade, paciência e oportunidades concedidas;*

*Ao Prof. Artur Smânia Jr por sua orientação, autenticidade, integridade, sinceridade e pelas partidas de futebol;*

*Aos meus pais e irmãos por todo o apoio e carinho;*

*Ao Prof. Maurício Sedrez dos Reis por sua grande contribuição no delineamento dos experimentos e na organização dos resultados;*

*Ao Prof. Orlando José Bernardini e a Fabrícia Kelly Pinho Silveira por terem realizado as fotografias usadas neste trabalho;*

*Ao Eduardo Comeli Goulart pela sua preciosa amizade, conselhos e apoio na estruturação dos resultados, bem como em outros momentos importantes;*

*Ao pessoal de todos os laboratórios que forneceram os produtos naturais com os quais realizei este trabalho, em especial ao colega Luciano Soares pelas informações transmitidas e pela amizade;*

*A todo o pessoal do Laboratório de Antibióticos da UFSC: Caroline J. S. Marques, Cynthia Seidel, Prof(a) Elza Smânia, Elídio Angioletto, Éverton Angioletto, Nelson Biacchi Junior, Roberta Paulert e Susana Johanm pelo apoio e incentivo, trocas de idéias, finais de semana compartilhados no laboratório, amizade e momentos de alegria;*

*Aos colegas Adolfo Haruo Koga, Luiz Carlos Pimentel e Maria Elisa Favarin por terem me fortalecido em momentos de desânimo com suas amizades e conselhos;*

*Ao Mauro César Coelho, funcionário da imprensa da UFSC, por ter auxiliado no preparo dos discos de papel filtro com muito boa vontade e satisfação de ajudar ao próximo;*

*Ao Prof. Alexsandro Branco pelas sugestões fornecidas e apoio;*

*Às pessoas que mesmo indiretamente colaboraram na realização deste trabalho.*

## SUMÁRIO

|  |     |
|--|-----|
| Resumo.....  | xi  |
| Abstract.....  | xii |
| 1. Introdução.....   | 1   |
| 1.1. Plantas medicinais.....   | 5   |
| 1.2. Fungos medicinais.....  | 7   |
| 1.3. Agentes antimicrobianos.....  | 9   |
| 1.4. Procedimentos usados para a obtenção de substâncias biologicamente ativas.....                              | 13  |
| 1.5. Estratégias para descoberta de fármacos de produtos naturais.....   | 16  |
| 1.6. Principais grupos de substâncias envolvidos com as atividades biológicas.....                               | 18  |
| 1.7. Determinação de atividade antimicrobiana de produtos naturais.....  | 20  |
| 2. Justificativa.....  | 22  |
| 3. Objetivos.....  | 23  |
| 3.1. Objetivo geral.....   | 23  |
| 3.2. Objetivos específicos.....  | 23  |
| 4. Materiais e métodos.....  | 24  |
| 4.1. Reagentes e meios de cultura.....   | 24  |
| 4.1.1. Solventes usados na solubilização de produtos naturais.....   | 24  |
| 4.1.2. Meios de cultura usados nos testes com bactéria.....  | 24  |
| 4.1.3. Reagente usado para a revelação dos testes.....   | 24  |
| 4.2. Produtos naturais.....  | 25  |
| 4.2.1. Extratos.....   | 25  |
| 4.2.2. Frações.....  | 27  |
| 4.2.3. Substâncias puras.....  | 28  |
| 4.2.3.1. Procedimentos experimentais para a obtenção do ácido 24-hidroxitormêntico.....                          | 28  |
| 4.2.3.2. Procedimentos experimentais para a obtenção dos orselinatos.....  | 29  |
| 4.2.4. Preparo dos produtos naturais para uso nos testes de atividade antibacteriana.....                        | 30  |
| 4.3. Métodos usados para determinar a atividade antibacteriana dos produtos naturais avaliados nesse estudo..... | 30  |
| 4.3.1. Organismos teste.....   | 30  |
| 4.3.2. Método de difusão em gel.....   | 31  |
| 4.3.2.1. Variante poço.....  | 31  |
| 4.3.2.1.1. Triagem dos produtos naturais.....  | 32  |
| 4.3.2.2. Variante disco.....   | 32  |
| 4.3.2.2.1. Aplicação dos produtos naturais nos discos de papel filtro.....                                       | 32  |
| 4.3.2.2.2. Procedimentos.....  | 32  |
| 4.3.3. Método bioautográfico.....  | 33  |
| 4.3.3.1. Variante direta (sem difusão para o ágar).....  | 33  |
| 4.3.3.2. Variante indireta (com difusão para o ágar).....  | 34  |

|  |    |
|--|----|
| 4.4. Comparação entre as variantes dos métodos estudados.....  | 35 |
| 5. Resultados e discussão.....   | 36 |
| 5.1. Triagem dos produtos naturais.....  | 36 |
| 5.2. Comparação entre os resultados obtidos com o uso das variantes do método de difusão em gel.....                                 | 40 |
| 5.3. Método bioautográfico.....  | 60 |
| 5.3.1. Estabelecimento de procedimentos adequados para a realização dos testes pela variante direta do método de bioautografia ..... | 60 |
| 5.3.2. Avaliação da técnica de aplicação do inóculo bacteriano na prática da bioautografia indireta.....                             | 63 |
| 5.3.3. Comparação entre os resultados obtidos com o uso das variantes do método bioautográfico.....                                  | 65 |
| 6. Considerações finais.....   | 78 |
| 7. Referências bibliográficas.....   | 80 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Reações de alcoólise do ácido lecanórico <b>1</b> , produzindo os orselinatos <b>2-9</b> e ácido orselínico <b>10</b> .....  | 29 |
| <b>Figura 2</b> – Estruturas dos orselinatos ( <b>2-9</b> ) e ácido orselínico ( <b>10</b> ).....  | 29 |
| <b>Figura 3</b> – Espectro antibacteriano dos produtos naturais que demonstraram atividade nos testes de triagem.....  | 36 |
| <b>Figura 4</b> – Modelo de sistema teste usado para o método de difusão variante poço.....  | 41 |
| <b>Figura 5</b> – Modelo de sistema teste usado para o método de difusão variante disco.....   | 41 |
| <b>Figura 6</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso dos extratos testados (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão.....          | 45 |
| <b>Figura 7</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso das frações testadas (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão.....           | 45 |
| <b>Figura 8</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso das substâncias puras testadas (1 mg) pelas duas variantes do método de difusão..... | 46 |
| <b>Figura 9</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método de difusão.....        | 46 |
| <b>Figura 10</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da <i>Escherichia coli</i> obtidas com o uso dos extratos testados (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão.....              | 49 |
| <b>Figura 11</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da <i>Escherichia coli</i> obtidas com o uso das substâncias puras testadas (1 mg) pelas duas variantes do método de difusão.....     | 49 |
| <b>Figura 12</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da <i>Escherichia coli</i> obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método de difusão.....            | 50 |
| <b>Figura 13</b> – Diferentes padrões de difusão nas variantes poço (A) e disco (B) do método de difusão em ágar.....  | 58 |
| <b>Figura 14</b> – Resultados da revelação dos sistemas -teste usando três concentrações do sal de <i>p</i> -iodonitrotetrazolium violeta e <i>Staphylococcus aureus</i> crescidos por 24 e 48 horas.....          | 61 |
| <b>Figura 15</b> - Modelo de sistema teste usado na variante indireta do método de bioautografia com o inóculo semeado com auxílio de “swab”.....  | 65 |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 16</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso dos extratos testados (400 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico.....          | 67 |
| <b>Figura 17</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso das frações testadas (200 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico.....           | 67 |
| <b>Figura 18</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso das substâncias puras testadas (100 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico..... | 68 |
| <b>Figura 19</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método bioautográfico.....          | 68 |
| <b>Figura 20</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento da <i>Escherichia coli</i> obtidas com o uso dos extratos testados (400 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico.....               | 69 |



## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Cronologia da descoberta de fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas.....  | 5  |
| <b>Tabela 2</b> – Caracterização dos produtos naturais usados e valores dos respectivos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos.....  | 39 |
| <b>Tabela 3</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidas nos testes de difusão, variante poço e variante disco, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais.....  | 43 |
| <b>Tabela 4</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> , obtidas nos testes de difusão, variante poço e variante disco, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais.....   | 48 |
| <b>Tabela 5</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidas com o uso de discos impregnados com 5 mg de extratos dissolvidos em DMSO, comparadas àquelas obtidas pelas duas variantes do método de difusão descritas neste estudo.....                  | 52 |
| <b>Tabela 6</b> - Resultados dos testes realizados pela variante direta do método bioautográfico com o uso do <i>Staphylococcus aureus</i> crescidos por 24 e 48 horas e revelados com três concentrações do sal de tetrazólio.....   | 61 |
| <b>Tabela 7</b> – Médias e erros padrões da média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> , obtidas pelo método de bioautografia, variante indireta, realizado com a suspensão bacteriana inoculada com o auxílio de “swab” e misturada com o ágar (“Pour Plate”)..... | 64 |
| <b>Tabela 8</b> – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento das bactérias <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> obtidas com o uso das variantes direta e indireta do método bioautográfico.....  | 66 |
| <b>Tabela 9</b> – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Staphylococcus aureus</i> obtidos nos testes bioautográficos, variante direta e variante indireta, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais...   | 71 |
| <b>Tabela 10</b> – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria <i>Escherichia coli</i> obtidos nos testes bioautográficos, variante direta e variante indireta, com o uso de várias concentrações dos extratos.....  | 72 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC – “American Type Culture Collection”

BHI – “Brain Heart Infusion”

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CHCl<sub>3</sub> – Triclorometano ou clorofórmio

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EM – Espectroscopia de Massa

FDA – “Food and Drug Administration”

GABA – Ácido  $\gamma$ -aminobutírico

GL – Graus de Liberdade

HTS – “High-Throughput Screening”

INT – Sal de *p*-iodonitrotetrazolium violeta

NCCLS – “National Committee for Clinical Laboratory Standards”

OMS – Organização Mundial da Saúde

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RNA – Ácido Ribonucleico

TSA – Teste de Sensibilidade aos Antibióticos

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

UV – Ultra Violeta

## RESUMO

Os produtos de origem natural são utilizados como fonte de medicamentos para tratar enfermidades que acometem o ser humano desde tempos imemoriais. A terapêutica moderna provavelmente não teria se desenvolvido tanto sem o suporte desses produtos. Porém, o aparecimento de novas doenças infecciosas, o ressurgimento de algumas infecções que pareciam estar controladas e o aumento da resistência bacteriana, criaram a necessidade de pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos antimicrobianos. Considerando o fracasso na obtenção de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir de microrganismos é de extrema importância uma adequação dos métodos de triagem para descoberta de antimicrobianos de outras fontes naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar métodos usados para triagem de produtos naturais com atividade antibacteriana, na tentativa de estabelecer critérios para o uso dos mesmos, considerando suas características particulares, uma vez que nos trabalhos publicados, os autores utilizam métodos aleatórios para esta finalidade. Sendo assim, 29 extratos, 17 frações e 9 substâncias puras foram testadas contra duas espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922, por duas variantes do método de difusão em ágar (poço e disco) e por duas variantes do método bioautográfico (direta e indireta). Os resultados mostraram que o método de difusão variante poço foi mais sensível que o método de difusão variante disco e que o método de bioautografia variante direta apresentou sensibilidade maior que o método de bioautografia variante indireta ( $p < 0.05$ ). Entre os dois métodos, o bioautográfico mostrou ser o mais sensível, uma vez que o mesmo detectou atividade antibacteriana com o uso da concentração dos extratos 10 vezes menor que aquela usada no método de difusão. Sugere-se ainda que, no método de difusão, as quantidades de extratos, frações e substâncias puras para a realização dos testes sejam de 4 mg, 3 mg e 0,5 mg, respectivamente. No método bioautográfico, o volume de 400 µg de extrato corresponde à quantidade apropriada para ser usada na realização dos testes. Em síntese, a opção por um dos métodos dependerá das condições de cada laboratório. Sugerimos que laboratórios com melhor infra-estrutura para métodos microbiológicos usem o método de difusão e aqueles mais voltados para química de produtos naturais usem o método bioautográfico.

Palavras-chave: métodos de triagem, atividade antibacteriana e produtos naturais.

## ABSTRACT

Products of natural origin are used as a source of medicines for the treatment of infirmities that have afflicted human beings since time immemorial. Modern therapies probably would not have developed to the same extent without the support of these products. However, the emergence of new infectious diseases, the resurgence of several infections that appeared to have been controlled and the increase in bacterial resistance have created the necessity for studies directed towards the development of new antimicrobials. Considering the failure to acquire new molecules with antimicrobial properties from microorganisms, the optimisation of screening methods used for the identification of antimicrobials from other natural sources is of great importance. The objective of this study was the evaluation of methods used for the screening of natural products with antibacterial activity, in an attempt to establish criteria for the use of such methods, taking into account their individual characteristics, since the authors of published studies have approached this objective using only random methods. Thus, 29 extracts, 17 fractions and 9 pure substances were tested against two bacterial species, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Escherichia coli* ATCC 25922, by two variants of the agar diffusion method (well and disc) and by two variants of the bioautographic method (direct and indirect). The results showed that the well variant of the diffusion method was more sensitive than the disc variant, whilst the direct variant of the bioautographic method exhibited a greater sensitivity than the indirect variant ( $p < 0.05$ ). Amongst the two methods, bioautography was found to be more sensitive, since it detected antibacterial activity with an extract concentration 10 times lower than that used in the diffusion method. This also suggests that, in the diffusion method, the quantities of extracts, fractions and pure substances used in the tests should be 4 mg, 3 mg and 0.5 mg, respectively. In the bioautographic method, a volume of 400  $\mu\text{g}$  of the extract corresponds to the appropriate quantity for carrying out the tests. Finally, the selection of one of the methods would depend on conditions in individual laboratories. It is suggested that laboratories with an infra-structure more suited to microbiological methods should use the diffusion method, whilst those more orientated towards the chemistry of natural products should use the bioautographic method.

Key words: screening methods, antibacterial activity, natural products.

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas, animais e minerais como fonte de medicamentos para tratar enfermidades que acometem o ser humano é uma prática há muito tempo empregada. Registros escritos como os antigos hieróglifos egípcios, a Bíblia e os manuais chineses de fitoterapia descrevem o uso extensivo de produtos naturais para fins medicinais. *Papaver sonniferum*, *Salix species* e *Silybum marianum*, entre outras espécies, eram usadas antes mesmo da era cristã. A partir dessas plantas foram isoladas respectivamente a morfina, a salicina e a silimarina (Grunwald, 1995; Cragg, 1997; Calixto, 2000; Barreiro e Fraga, 2001).

A terapêutica moderna, composta de um grande número de medicamentos com ações específicas sobre receptores, enzimas e canais iônicos, não teria sido possível sem o suporte dos produtos naturais, especialmente as plantas superiores, as toxinas animais e os microrganismos. São inúmeros os exemplos de medicamentos desenvolvidos direta ou indiretamente de fontes naturais, sobretudo de plantas. Destacam-se a morfina, a pilocarpina, os digitálicos, os curares, a quinina, a artemisinina, a atropina, a escopolamina, as estatinas, o cromolin, as drogas usadas no tratamento de câncer (vimblastina, vincristina, taxol, campotecinas), os imunossuppressores, os antibióticos, os inibidores da enzima conversora de angiotensina, como o captopril (Verpoorte, 1998; Grabley e Thiericke, 1999; Lawrence, 1999; Oliveira *et al.*, 1999; Strohl, 2000; Barreiro e Fraga, 2001).

Atualmente a natureza continua sendo a maior fonte de medicamentos para a humanidade. O mercado mundial desse grupo de drogas atinge vários bilhões de dólares. Nos países desenvolvidos, os fitoterápicos movimentam cerca de 12 bilhões de dólares anuais. Estima-se que 41% dos medicamentos disponíveis na terapêutica moderna tenham sido desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Só no período de 1989-1994, cerca de 200 medicamentos aprovados pela "Food and Drug Administration" - FDA, agência americana de controle de medicamentos e alimentos, foram obtidos de fontes naturais. Além disso, aproximadamente um

terço dos medicamentos mais prescritos e vendidos no mundo veio dessas fontes. Se considerarmos as drogas anticancerígenas e os antibióticos isoladamente, esse percentual cresce, atingindo aproximadamente 70%. Embora até o momento apenas 10% da biodiversidade mundial tenham sido estudados, cerca de 140 mil metabólitos intermediários, oriundos sobretudo de plantas superiores, já foram isolados e caracterizados. A maioria, no entanto, ainda não foi avaliada biologicamente, demonstrando o potente arsenal terapêutico que são as plantas medicinais (Cragg, 1997; Harvey, 2000; Strohl, 2000).

Os compostos de origem natural desempenham quatro papéis importantes na medicina moderna. Em primeiro lugar, fornecem alguns medicamentos extremamente úteis, cuja produção e comercialização na forma sintética é difícil, se não impossível. Entre eles estão grupos tão diversificados de substâncias como os alcalóides da papoula produtora de ópio, do esporão do centeio e das plantas solanáceas; os glicosídeos cardiotônicos da digital; a maioria dos antibióticos e todos os soros, vacinas e produtos afins. De fontes naturais também são retirados compostos básicos que podem ser ligeiramente modificados para tomarem-se mais eficazes e/ou menos tóxicos, como por exemplo as numerosas variações da molécula da morfina. O terceiro papel desempenhado pelos produtos naturais é a sua utilidade como protótipos ou modelos para medicamentos sintéticos que tenham atividades fisiológicas semelhantes às dos originais. A procaína e os anestésicos locais similares a essa costumam ser citados como representantes dessa categoria. Há um quarto papel desempenhado pelos produtos naturais, bem diferente dos acima citados, mas não menos importante. Alguns produtos naturais contêm compostos que apresentam atividade pequena ou nula em si mesmos, mas devido à facilidade de obtenção desses compostos, os mesmos podem ser usados como molécula-base para produzir drogas potentes por métodos químicos ou biológicos. Por exemplo, a bacatina III é facilmente obtida das folhas de várias espécies de teixo, uma planta rara do Pacífico e, a partir dessa substância, é possível sintetizar o taxol, encontrado apenas na casca dessa planta (Robbers *et al.*, 1997).

Uma avaliação estatística realizada por Henkel e colaboradores (1999) demonstrou uma distinta diferença nas propriedades estruturais de produtos

naturais em relação aos compostos sintéticos. Comparado com compostos sintéticos, os produtos naturais geralmente têm pesos moleculares superiores e exibem uma distribuição diferente de heteroátomos (alta incidência de grupos contendo O- e baixa incidência de grupos contendo N-, S- e halogênios). Eles compreendem elementos estruturais que estão sub-representados pelos compostos sintéticos (40% das moléculas de origem de produtos naturais estão ausentes na química sintética) e contêm significativamente mais anéis e centros quirais. Além de suas estruturas estericamente complexas eles são distintos por uma combinação característica de grupos farmacofóricos. Essas características ressaltam a diversidade de compostos que podem ser obtidos de produtos naturais que, por outro lado, seriam perdidos usando técnicas sintéticas (Henkel *et al.*, 1999). Neste sentido, Harvey (2000) demonstrou que os produtos naturais que são biologicamente ativos nos ensaios são geralmente moléculas pequenas com propriedades de drogas, sendo capazes de serem absorvidos e metabolizados pelo corpo.

Em virtude dos elevados custos de produção de um novo medicamento (entre US\$ 350 milhões e US\$ 500 milhões, aproximadamente) e do longo tempo gasto em pesquisas (de 10 a 15 anos), o preço final dos medicamentos para o consumidor é geralmente elevado. Aliás, parte considerável da população de países pobres e em desenvolvimento não tira proveito dos recursos da medicina moderna (Moerman, 1991; Farnsworth, 1994; Calixto, 2000).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (Akerele, 1993), 65 a 80% da humanidade não tem acesso à medicina alopática e recorre à medicina tradicional (especialmente às plantas medicinais) para tratar suas patologias, seja por habitar longe dos centros urbanos, seja por não poder pagar um tratamento medicamentoso. A própria OMS não só reconhece como também estimula o uso dessas plantas, embora recomende cuidados especiais para essa prática. Além disso, os inúmeros efeitos colaterais e a ineficiência de alguns medicamentos no tratamento de inúmeras doenças, proporcionaram, nos últimos anos, um incremento considerável na utilização de produtos naturais (Moerman, 1991; Farnsworth, 1994; De Smet, 1997; Calixto, 2000). Os fitoterápicos têm sido, no

caso do Brasil e de muitos países, o suporte da indústria farmacêutica genuinamente nacional de pequeno e médio porte (Farias *et al.*, 1994).

Entre as maiores indústrias farmacêuticas mundiais, 17 têm programas na área de produtos naturais e 14 comercializam medicamentos desenvolvidos a partir desses produtos (Blumenthal, 1999). Sua utilização como ponto de partida para o desenvolvimento de novos medicamentos oferece, entre outras, as seguintes vantagens: grande quantidade de estruturas químicas, aumentando a chance de descobrir novas moléculas para alvos moleculares complexos; muitas classes de estruturas homólogas; possibilidade de utilização como banco de moléculas para ensaios de alta capacidade; economia de tempo e recursos em casos especiais (Lawrence, 1999; Harvey, 2000; Strohl, 2000).

No Brasil, o comércio interno de medicamentos registrados foi de 2,9 bilhões de dólares americanos em 1992 (IMS, 1992), o que corresponderia a um consumo médio per capita de 20 dólares anuais. As estimativas de 1997 colocam o mercado brasileiro entre o 4º ou 5º do mundo, com vendas que atingem 10,5 bilhões de dólares americanos, o que representa um consumo de 50 dólares per capita/ano. Apesar disso, as estatísticas não mostram aumento das unidades de produtos vendidos em relação ao período anterior, indicando, portanto, que o medicamento continua inacessível às classes menos privilegiadas (Folha de São Paulo, 1997). Apenas 20% da população são responsáveis por 63% do consumo dos medicamentos disponíveis, o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente as plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (Di Stasi, 1996). A interpretação desses dados evidencia que o comércio de medicamentos, no Brasil, atende apenas a uma pequena faixa da população, sendo o restante das pessoas forçadas a utilizar produtos de venda não registrada para minorar suas dores e corrigir distúrbios funcionais de fácil percepção. É nesse contexto social que os produtos naturais adquirem importância como agentes terapêuticos e, por isso, devem ser prioritariamente analisados segundo os métodos modernos disponíveis (Simões *et al.*, 2000).

Estima-se que o Brasil tenha cerca de 50 mil espécies vegetais, 524 espécies de mamíferos, três mil de peixes, 1622 de pássaros, 517 de anfíbios,



467 de répteis, 10 -15 milhões de insetos, além de milhões de espécies de microrganismos. Considerando o valor estratégico dos recursos naturais (já muito escassos ou mesmo inexistentes nos países desenvolvidos) e sua potencialidade econômica (que pode atingir a impressionante cifra de alguns trilhões de dólares), o interesse internacional pelo controle e exploração da diversidade biológica tem aumentado expressivamente nos últimos anos. Em consequência, têm sido acaloradas as discussões sobre o tema entre políticos, órgãos governamentais nacionais e internacionais e a própria comunidade científica (Calixto, 2000).

### 1.1. PLANTAS MEDICINAIS

A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos pode ser sucintamente demonstrada pela cronologia contida na tabela 1 (Rocha e Silva, 1973).

**Tabela 1** – Cronologia da descoberta de fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas

| Gênero                | Fármaco      | Data do isolamento | Categoria terapêutica    |
|-----------------------|--------------|--------------------|--------------------------|
| <i>Digitalis</i>      | Digitoxina   | 1785-1875          | Cardiotônico             |
| <i>Papaver</i>        | Morfina      | 1805               | Hipnoanalgésico          |
| <i>Cinchona</i>       | Quinina      | 1820               | Antimalárico             |
| <i>Atropa</i>         | Atropina     | 1833               | Anticolinérgico          |
| <i>Physostigma</i>    | Fisostigmina | 1864               | Anticolinesterásico      |
| <i>Pilocarpus</i>     | Pilocarpina  | 1875               | Colinérgico              |
| <i>Ephedra</i>        | Efedrina     | 1887               | Adrenérgico              |
| <i>Erythroxylum</i>   | Cocaína      | 1895               | Anestésico local         |
| <i>Chondrodendrum</i> | Tubocurarina | 1895               | Bloqueador neuromuscular |
| <i>Claviceps</i>      | Ergotamina   | 1922               | Bloqueador adrenérgico   |
| <i>Melilotus</i>      | Dicumarol    | 1941               | Anticoagulante           |
| <i>Rauwolfia</i>      | Reserpina    | 1952               | Neuroléptico             |

Fonte: Rocha e Silva, 1973.

O reino vegetal representa um extraordinário reservatório de novas moléculas. Segundo Pimm e colaboradores (1995) existem 250.000 espécies de plantas distribuídas no globo. Entretanto, somente uma pequena porcentagem tem sido investigada fitoquimicamente e a fração submetida para triagem de atividades biológicas ou farmacológicas é ainda menor. Uma vez que plantas

podem conter centenas, ou ainda milhares de metabólitos, existe correntemente um ressurgimento de interesse no reino vegetal como uma possível fonte de novos compostos para introdução em programas de triagem terapêutica (Hostettmann *et al.*, 1997).

O rápido desaparecimento das florestas tropicais e outras áreas importantes da vegetação têm exigido um acesso a métodos que levam para um isolamento rápido e identificação de produtos naturais bioativos. Os processos usados para obter uma substância derivada de planta envolvem trabalho interdisciplinar em botânica, farmacognosia, farmacologia, química, microbiologia e toxicologia (Hostettmann *et al.*, 1997).

Estima-se que a flora brasileira possui cerca de 50 mil espécies vegetais (Calixto, 2000), o que corresponde a 20% do total do planeta, conforme o número de espécies descrito por Pimm e seus colaboradores (1995). Segundo Plotkin (1991), o Brasil é o país com maior número de espécies no mundo.

Muitos são os trabalhos publicados que demonstram atividades biológicas relacionadas com substâncias isoladas de plantas medicinais. Referindo-se em especial a atividade antibacteriana de extratos e/ou substâncias derivadas de plantas, pesquisadores como Ojala e colaboradores (2000), Ahmad e Beg (2001), Ali e colaboradores (2001), Bisignano e colaboradores (2001), Eloff (2001) e Okeke e colaboradores (2001) descreveram esse efeito.

Atividades antiprotozoários de extratos de plantas usadas na medicina tradicional na Colômbia foram demonstradas por Weniger e colaboradores (2001). Esses pesquisadores descreveram efeitos dos extratos contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania spp.* e contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Alves e colaboradores (1997) também descreveram propriedades antiparasitárias de compostos isolados de plantas.

Atividade antifúngica, antioxidante, antitumoral e citotóxica foram relatadas por Mackeen e colaboradores (2000). Efeitos antivirais (Sun *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 1996), antiinflamatórios e analgésicos (Peters *et al.*, 1997; Okpo *et al.*, 2001) também já foram descritos.

Outras propriedades de produtos obtidos de plantas já evidenciadas foram: imunomodulatórias (Makare *et al.*, 2001), sobre o sistema nervoso central (Adzu *et al.*, 2002), antiespasmódicas (Kirimer *et al.*, 1997; Trute *et al.*, 1997), antidiarrêicas e gastroprotetoras (Lin *et al.*, 2002), sobre a pressão sangüínea e coagulação (Singh *et al.*, 2001), diuréticas (Galati *et al.*, 2002), antioxidantes (Sultanova *et al.*, 2001), antidepressivas (Sánchez-Mateo *et al.*, 2002), anticarcinogênicas (Babu *et al.*, 2002), hepatoprotetoras (Jeong *et al.*, 1997; Ahmad *et al.*, 2002; Mahmoud *et al.*, 2002), hipoglicemiantes (Majeed, 1998; Andrade-Cetto e Wiedenfeld, 2001; Vats *et al.*, 2002), ansiolíticas (Dhawan *et al.*, 2001), sobre os níveis séricos de lipídeos (Anila e Vijayalakshmi, 2002; Zaqui *et al.*, 2002), entre outras.

## 1.2. FUNGOS MEDICINAIS

Os fungos são organismos eucarióticos, cujos núcleos são dispersos em um micélio (conjunto de hifas) contínuo ou septado. Não possuem plastos ou pigmentos fotossintéticos e sua nutrição é obtida por absorção. São saprofíticos, parasitos facultativos ou biotróficos, ou ainda simbiontes. São predominantemente filamentosos, mas algumas espécies são leveduriformes (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Na área da micologia médica e veterinária, bem como na micologia industrial, são conhecidas inúmeras espécies de fungos leveduriformes. Entretanto, na área da patologia vegetal são raros os representantes que apresentam essa característica. Portanto, a quase totalidade dos fungos fitopatogênicos apresenta o sistema vegetativo (micélio) filamentoso e ramificado. Os fungos fitopatogênicos podem apresentar frutificações de duas naturezas, ou seja, a da forma teleomórfica, antigamente denominada "forma perfeita" ou sexuada e frutificações assexuadas ou clonais, antigamente denominadas "forma imperfeita" e hoje, anamórficas (Alexopoulos *et al.*, 1996).

Diversos produtos naturais com importantes propriedades farmacológicas foram identificados em diferentes espécies de fungos (Barreiro e Fraga, 2001). A

avermectina B<sub>1</sub>, um macrolido isolado de *Streptomyces sp.*, é um potente agente anti-helmíntico recomendado, inclusive, para o combate ao *Schistosoma mansoni* (Babu, 1988). Derivados antracíclicos isolados de *Streptomyces sp.*, como a daunorubicina, a doxorubicina e a bleomicina A<sub>2</sub> têm atividade anticancerígena (Hecht, 1995). A gliotoxina isolada de diversas espécies de *Aspergillus* apresenta propriedades antibióticas (Barreiro e Fraga, 2001). O muscinol isolado de *Amanita muscaria* apresenta propriedades GABA-érgicas centrais (Lummis *et al.*, 1991).

Vários são os fungos superiores que vem sendo utilizados na medicina tradicional, a maioria pertence à classe Basidiomycetes. Basidiomycetes superiores contêm aproximadamente 10.000 espécies de 550 gêneros e 80 famílias (Dudka e Wasser, 1987; Hawksworth *et al.*, 1995).

Os Basidiomycetes superiores têm sido usados na medicina popular no mundo desde tempos ancestrais (Lucas *et al.*, 1957; Wasson, 1968; Yang e Jong, 1989; Mizuno, 1993, 1995a,b, 1996, 1997, 1998a,b; Wasser, 1997; Wasser e Weis, 1997a,b, 1999a,b). Com base no conhecimento popular, muitas espécies de fungo têm sido estudadas e um grande número de componentes celulares e metabólitos secundários derivados dessas apresentaram efeitos biológicos (Mizuno, 1995a, b., 1996, 1998a,b; Mizuno, Sakai e Chihara, 1995; Smânia *et al.*, 1995; Wasser, 1997, Wasser e Weis, 1999a, b).

Entre os efeitos já comprovados em laboratório, podem ser citados: estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (Kurashige *et al.*, 1997; Bobek *et al.*, 1998a); sobre desordens cardiovasculares (Yao *et al.*, 1998), diminuição do nível de colesterol sangüíneo (Bobek *et al.*, 1998b); atividades antitrombótica, hipotensiva, antidiabética (Mizuno, 1996, 1998a,b; Liu, 1999; Wasser e Weis, 1999 a,b), entre outros. Alguns fungos medicinais mostraram efeitos benéficos para uma ampla variedade de desordens hepáticas, incluindo hepatite, como relatado por Hobbs (1995). Efeitos antiinflamatórios de preparações de Basidiomycetes foram descritos por Noda-Shokkin (1998a).

As atividades antibacteriana (Smânia *et al.*, 1995; Wasser e Weis, 1999a,b), antiviral (Aoki, 1984; Sarkar *et al.*, 1993; Noda-Shokukin, 1998c) e antiparasitária (Ying *et al.*, 1987) de substâncias extraídas de Basidiomycetes

também têm sido demonstradas por vários pesquisadores. Basidiomycetes usados contra câncer de estômago, esôfago, intestino, entre outros, são conhecidos na China, Rússia, Japão e Coréia, bem como nos Estados Unidos e Canadá (Takatsu *et al.*, 1998; Mizuno, 1999; Wasser e Weis, 1999 a,b).

Hawksworth (1991) estimou que no mundo todo existe aproximadamente 1,5 milhões de espécies de fungos. No entanto, somente 69.000 espécies têm sido descritas. Essa discrepância existente entre o número estimado e o número de espécies descritas provavelmente se deve ao estudo insuficiente dos fungos de algumas partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais.

### 1.3. AGENTES ANTIMICROBIANOS

Em 1928, Alexander Fleming, um biólogo escocês, observou que *Penicillium notatum*, um fungo comum do ar, tinha inibido o crescimento da bactéria *Staphylococcus sp.* em cultura, e em 1939 a penicilina foi finalmente isolada e, usada pela primeira vez, em 1941 no tratamento de infecções humanas. No verão de 1943, Robert Robinson e colaboradores elucidaram a estrutura da penicilina-G, viabilizando sua síntese. Em 1939 também, o microbiologista americano René Dubos descobriu a tirotricina, uma mistura de dois peptídeos: gramicidina e tirocidina obtida a partir de *Bacillus brevis* isolados do solo. Embora tal substância tenha se mostrado tóxica para uso sistêmico, poderia ser usada com bom efeito quando aplicada como pomada nas superfícies do corpo. Em 1944 Selman Waksman e Albert Schatz, microbiologistas americanos, isolaram estreptomicina e um número de outros antibióticos de *Streptomyces griseus*. Após a Segunda Guerra Mundial, continuaram os esforços para encontrar novas estruturas antibióticas. Tais esforços culminaram na descoberta da bacitracina (1945), do cloranfenicol (1947), da clortetraciclina (1948), da eritromicina (1952) e da cicloserina (1955). Em 1955 foi descoberta também a cefalosporina C e em 1962 pesquisadores identificaram o ácido nalidíxico (Tavares, 1984; Patrick, 1995; Barreiro e Fraga, 2001).

Como resultado dos estudos e procura de novos antibióticos, bem como do aperfeiçoamento de sua obtenção, surgiu um gigantesco desenvolvimento da indústria farmacêutica, sendo numerosos os antibióticos atualmente existentes, a maioria deles sem aplicabilidade prática devido aos seus efeitos tóxicos sobre o homem. A espetacular ação dessas substâncias no tratamento dos processos infecciosos, mormente os de etiologia bacteriana, veio modificar a atenção dispensada a certas doenças, bem como as estatísticas de letalidade (Tavares, 1984).

A palavra “antibiótico” deriva do termo *antibiosis*, que literalmente significa “contra a vida” (*anti* = contra; *bios* = vida). O conceito formal mais aceito por cientistas especializados define o antibiótico como uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. O componente mais crítico dessa definição é a “seletividade” ou a “toxicidade seletiva”, significando que o composto deve inibir ou matar o microrganismo sem inibir ou matar o organismo hospedeiro (por exemplo, o ser humano). Em essência, todas as definições limitam os antibióticos a compostos capazes de atuar em baixas concentrações. Essa definição exclui compostos como o etanol, por exemplo, que são ativos em concentrações maiores e tendem a exercer ação principalmente física sobre os microrganismos (esses compostos geralmente são conhecidos como “anti-sépticos”). A definição formal também exclui os compostos sintéticos, que, no entanto, juntamente com outros compostos naturais e seus derivados, são incluídos na categoria de “antimicrobianos” (que também pode ser subdividida segundo o tipo específico de microrganismo que deve ser inibido, como por exemplo antifúngicos, antibacterianos, entre outros) (Robbers *et al.*, 1997).

Há diversas maneiras de classificar os antimicrobianos. Podem ser classificados segundo a sua origem, efeito antimicrobiano, espectro de atividade e mecanismo de ação. Segundo a origem, os antimicrobianos podem ser naturais, sintéticos ou semi-sintéticos. Considerando-se o efeito dos antimicrobianos têm-se aqueles bacteriostáticos e aqueles bactericidas. De acordo com o seu espectro de ação os antimicrobianos são divididos em três categorias: amplo espectro,

espectro intermediário e espectro reduzido. Por último, os antimicrobianos são classificados segundo o mecanismo de ação e, sendo assim, eles agem inibindo a síntese da parede celular, alterando a permeabilidade celular, inibindo a síntese protéica ou inibindo a síntese de DNA ou RNA (Silva, 1999). Além disso, é comum a classificação dos antimicrobianos pela estrutura química (Tavares, 1984).

É interessante notar que, devido à complexidade estrutural das substâncias antibióticas, a maioria daquelas que estão sendo comercializadas continuam tendo a sua estrutura básica produzida por fermentação, mesmo depois de desenvolvida alguma técnica para a síntese total. Essa é a diferença marcante em relação a muitos outros produtos, que são identificados em fontes naturais mas depois são produzidos por métodos sintéticos (Robbers *et al.*, 1997).

Muitos fungos do solo e bactérias produzem antibióticos para controlar e matar os microrganismos competidores que põem em perigo seu nicho ecológico. Os microrganismos produtores de antibióticos portam um gene para produzir o antibiótico, porém também portam genes de resistência aos antibióticos para que o próprio microrganismo não seja destruído (Harris *et al.*, 1995).

Até três décadas atrás era freqüente a utilização de amostras de solo na busca de novos antibióticos, uma vez que essas tinham demonstrado serem ricas em microrganismos produtores dessas substâncias. Foram desenvolvidos métodos relativamente simples e rápidos para selecionar previamente esses microrganismos, os quais pertencem, pelo menos a maioria, ao grupo dos actinomicetos (Robbers *et al.*, 1997).

Um estudo sobre fontes microbianas de antibióticos realizado nos Estados Unidos e no Japão entre 1953 e 1970 revelou que aproximadamente 85% deles eram produzidos por actinomicetos, 11% por fungos e 4% por outras bactérias. Como era esperado, também foi observado uma diminuição progressiva no número de compostos isolados a partir de análises do solo, e as atenções começaram a se voltar para outras fontes dessas substâncias, entre as quais destaca-se o habitat marinho. Além disso, cresceu o interesse por programas induzidos para a pesquisa de substâncias ativas. Exemplos desses pode ser considerada a pesquisa dirigida contra organismos patogênicos que causam

infecções para as quais contamos com terapias insuficientes, tais como os fungos e os vírus, bem como as bactérias muito resistentes, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* resistente à meticilina (Robbers *et al.*, 1997).

Atualmente existe cerca de 4.000 antibióticos conhecidos, sendo que desses a maioria é tóxica ou então os custos de produção são tão altos que impedem sua utilização. Assim, só uns 50 são usados de fato na atualidade. Uma vez que os antibióticos estão entre os medicamentos mais utilizados nos dias atuais, sua indústria é uma das mais importantes. Foi na produção de antibióticos que os primeiros exemplos de aplicação da Genética de Microrganismos começaram a surgir e a frutificar. Um resultado espetacular foi conseguido no melhoramento de *Penicillium chrysogenum* para a produção de penicilina, desde a linhagem de Fleming, com cerca de 2µg/mL de produção, até linhagens que hoje produzem milhares de vezes mais (Azevedo, 1998).

A descoberta de uma nova substância com propriedades antimicrobianas costuma ser apenas o início de uma longa trajetória a ser percorrida para a aprovação de um novo antibiótico. Antes de se tomar a decisão de produzi-lo em escala comercial devem ser feitos estudos sobre suas propriedades químicas, físicas e biológicas. Outros fatores que devem ser considerados são: estabilidade química, concentração inibitória mínima contra cepas de organismos patogênicos, manifestações tóxicas em mamíferos e atividade *in vivo* (Robbers *et al.*, 1997).

O incremento do uso de antibióticos na medicina humana e veterinária, na agricultura, na preservação de alimentos, na suplementação de rações de aves e de outros animais tem ocasionado os conhecidos problemas de resistência microbiana a drogas (Azevedo, 1998; Levy, 2001).

A aquisição de resistência aos antimicrobianos pode ocorrer mediante mutação espontânea ou por mecanismos de transferência horizontal de genes de resistência de um microrganismo a outro (Patrick, 1995; Levy, 1998).

Os processos bioquímicos que intervêm na resistência aos antibióticos se baseiam em cinco mecanismos, a saber: 1) o microrganismo pode inativar o medicamento antes que este alcance seu alvo dentro da célula; 2) a superfície da



célula pode tornar-se impermeável e impedir a entrada do medicamento; 3) o medicamento entra na célula, porém é expulso; 4) o alvo do fármaco dentro da célula se altera para que não seja reconhecido pelo antibiótico; e 5) as bactérias adquirem uma via metabólica alternativa que torna ineficaz o antibiótico (Azevedo, 1998).

Apesar da ampla disponibilidade de antibióticos clinicamente úteis e análogos semi-sintéticos, a pesquisa contínua de novos agentes anti-infecciosos permanece indispensável, uma vez que a combinação da versatilidade genética dos microrganismos e o uso indiscriminado dos antibióticos têm levado ao aumento da resistência clínica de microrganismos previamente sensíveis e a emergência de infecções anteriormente incomuns. Além disso, novas classes de antibióticos agindo sobre alvos moleculares completamente diferentes dos atuais não têm sido desenvolvidas a mais de 25 anos. O desenvolvimento de novas drogas antivirais também deve ser mantido, especialmente porque as disponíveis limitam-se ao tratamento de uma ou somente umas poucas viroses (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991; Hancock, 1997; Knowles, 1997; Leclerc, 1997; Levy, 1998).

#### **1.4. PROCEDIMENTOS USADOS PARA A OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOLOGICAMENTE ATIVAS**

A detecção rápida de compostos biologicamente ativos desempenha um papel estratégico na investigação fitoquímica de extratos brutos de produtos naturais (Hostettmann *et al.*, 1997).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivo descobrir novos constituintes químicos de espécies vegetais ou confirmar a presença de alguns já conhecidos. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundários relevantes na mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por uma certa atividade biológica, a

investigação deverá ser direcionada para o isolamento e a elucidação estrutural das mesmas (Simões *et al.*, 2000).

A primeira etapa da investigação química é a coleta do material de origem natural (vegetal, fungo, entre outros). É essencial que se prepare uma excisata para a identificação e que a seleção do material coletado seja feita com cuidado. Deve-se registrar o local, a hora e a data da coleta, uma vez que estas variáveis podem exercer grande influência sobre a produção e o acúmulo dos metabólitos secundários (Alves e Pavani, 1991). A utilização de material fresco pode ser indispensável para a detecção de alguns componentes específicos, mas neste caso, o material deve ser processado imediatamente ou conservado, até a análise, a baixas temperaturas. Já o emprego de material seco, empregado devido a sua maior estabilidade química, exige cuidados especiais, a fim de interromper os processos metabólicos que ocorrem mesmo após a coleta (Simões *et al.*, 2000).

Após a coleta, normalmente faz-se a secagem e estabilização do material coletado e, em seguida, esse material é moído para prepará-lo para o processo de extração. O aumento da área de contato entre o material sólido e o líquido extrator torna mais eficiente a operação. A escolha das dimensões mais apropriadas depende também da textura do órgão vegetal. Quanto mais rígidos forem os tecidos, maior será o grau de divisibilidade necessário (Simões *et al.*, 2000).

Antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração uma série de fatores que interferem nesta operação, tais como as características do material vegetal, o seu grau de divisão, o meio extrator (solvente) e a metodologia de extração. Na escolha de um método extrativo, deve-se avaliar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Como a composição química das plantas é extremamente complexa, muito freqüentemente ocorre a extração concomitante de vários tipos de substâncias, farmacologicamente ativas ou não, desejadas ou não. Por isso, deve-se primeiramente definir, com a maior precisão possível, o que se deseja obter. De

acordo com essa definição e levando-se em consideração os fatores envolvidos no processo extrativo, pode-se escolher o método e o solvente que serão empregados (Verpoorte, 1998; Simões *et al.*, 2000).

Dependendo do solvente usado no método de extração, diferentes quantidades e tipos de compostos podem ser extraídos de materiais de plantas. Na literatura são descritos alguns esquemas de extração, uns altamente seletivos para um certo grupo de compostos, outros gerais, usando uma variedade de passos consecutivos indo de solventes apolares (como éter de petróleo) para solventes altamente polares (como metanol e água) (Verpoorte, 1998).

Existem atualmente vários métodos utilizados na extração de metabólitos de plantas e de outros organismos. Alguns desses métodos empregam extrações a frio (turbolização, maceração e percolação), outros empregam extrações a quente em sistemas abertos (infusão e decocção) e outros ainda empregam extrações a quente em sistemas fechados (extração sob refluxo e extração em aparelho de Soxhlet) (Simões *et al.*, 2000).

Para algumas substâncias podem-se realizar reações de caracterização diretamente sobre os tecidos do material. Entretanto, na maioria das vezes, para proceder à caracterização de um determinado grupo de substâncias presentes no material em análise, deve-se primeiro extrair essas substâncias com um solvente adequado, para, então, caracterizá-las no extrato (Simões *et al.*, 2000).

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vistas ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica (Dey e Harborne, 1991). Mais recentemente, também vêm sendo utilizado o monitoramento das frações por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta e espectrofotômetro de massa (CLAE/UV/EM) ou de ressonância magnética nuclear (CLAE/RMN). Essas combinações possibilitam direcionar as operações de fracionamento para o isolamento daqueles compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos (Hostettmann *et al.*, 1997). Entre os métodos mais comumente utilizados para o fracionamento de extratos brutos de produtos vegetais pode-se destacar a partição por solventes

imiscíveis e os métodos cromatográficos (cromatografia de partição, cromatografia de adsorção, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão ou de filtração molecular, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia líquida em coluna) (Simões *et al.*, 2000).

O processo de descoberta de fármacos tem sido apoiado significativamente na evolução de tecnologias como “High -Throughput Screening” - HTS; química combinatória e tecnologias fundamentadas na biologia molecular. No entanto, o valor da química combinatória e da técnica HTS como uma fonte de moléculas úteis tem sido questionado (Myers, 1997; Lahana, 1999). A química combinatória tem demonstrado não ser apropriada para a obtenção de fármacos para alvos moleculares que interagem de forma mais complexa com as moléculas. Para tais alvos, a diversidade química dos produtos naturais é mais vantajosa (Myers, 1997). Muitos organismos não são apropriados para técnicas HTS, especialmente aqueles de crescimento lento. Outras complicações do uso de HTS para a descoberta de fármacos a partir de produtos naturais incluem a produção de misturas de compostos com efeitos antagonistas e sinérgicos, as altas taxas de redundância e o longo tempo de espera pelos resultados dos ensaios biológicos (Lahana, 1999). Além disso, o tempo para a otimização química de moléculas ativas de produtos naturais tem diminuído cada vez mais (Lawrence, 1999).

A elucidação estrutural é o passo final para a identificação dos compostos naturais isolados. Entre os métodos físicos de análise empregados atualmente na determinação estrutural, a espectroscopia de massa, a espectroscopia no ultravioleta (UV), no visível e no infravermelho, bem como as ressonâncias magnéticas nucleares (RMN) de próton e carbono 13 constituem os mais amplamente empregados (Simões *et al.*, 2000; Barreiro e Fraga, 2001).

## **1.5. ESTRATÉGIAS PARA DESCOBERTA DE FÁRMACOS DE PRODUTOS NATURAIS**

A existência estimada de milhões de espécies de organismos (Pimm *et al.*, 1995) e as dificuldades encontradas atualmente nos programas de pesquisa de

produtos naturais ativos (Strohl, 2000; Bindseil *et al.*, 2001) criam a necessidade de inovação nas estratégias para a descoberta de novas moléculas para o desenvolvimento de fármacos, e assim, tornar o processo mais eficiente, barato e rápido.

Até o presente, entre as estratégias mais usadas, destacam-se duas: uma é a triagem de produtos naturais de fontes previamente inexploradas (Harvey, 2000) e a outra é o estudo de produtos naturais usados na medicina tradicional. Outro critério de seleção que pode ser adotado para reduzir o número de organismos a ser triado refere-se às observações ecológicas, como por exemplo, preparações inseticidas que são derivadas de plantas que não são atacadas por determinados insetos (Verpoorte, 1998).

Adicionalmente as estratégias mencionadas acima, algumas outras medidas têm sido descritas e estão ganhando adeptos. Para otimizar as chances de encontrar novas moléculas através da técnica HTS, preparações de extratos de partes selecionadas de plantas, mudas de plantas e culturas de células de plantas, aparentemente seriam alternativas promissoras, pois reduziria a variabilidade encontrada naturalmente nas plantas (Verpoorte, 1998). Uma nova e excitante possibilidade está próxima de se tornar realidade, a qual se refere à aplicação da engenharia genética na produção de novos compostos pela incorporação de vias metabólicas apropriadas de organismos não cultiváveis no interior de espécies convenientes (Verpoorte, 1998; Harvey, 2000). Em microrganismos esta técnica já está sendo empregada (Hutchinson e Fujii, 1995). Essa opção também parece ser possível em plantas, uma vez que a maioria dos metabólitos secundários é derivada de somente uns poucos “blocos de construção”, mas após a formação dos esqueletos básicos, cada espécie de planta tem diferentes enzimas altamente específicas que modificam esses compostos, criando uma grande quimiodiversidade (Verpoorte, 1998).

Ainda usando as ferramentas da engenharia genética, Knowles (1997) e Cassell e Mekalanos (2001) propõem um novo modelo para a descoberta de agentes terapêuticos. Esse novo modelo é baseado nos seguintes pontos: 1- dados das seqüências dos genomas microbianos, juntamente com alternativas

computacionais (bioinformática) e laboratoriais apropriadas, providenciarão uma base racional sobre quais alvos moleculares deverão ser selecionados para a terapia contra infecções; 2- triagens de compostos baseadas nos alvos moleculares, aliadas a alternativa da química combinatória e ao “design” racional de fármacos, oferecendo oportunidades maiores para a descoberta de novos antibacterianos.

#### **1.6. PRINCIPAIS GRUPOS DE SUBSTÂNCIAS ENVOLVIDOS COM AS ATIVIDADES BIOLÓGICAS**

O organismo vivo pode ser considerado um laboratório biossintético não só no que se refere aos compostos químicos (carboidratos, proteínas, gorduras) utilizados como alimentos pelos seres humanos e pelos animais, mas também no que se refere a uma infinidade de outras substâncias (glicosídeos, alcalóides, terpenóides) que exercem efeitos fisiológicos. São estes últimos que estão mais diretamente relacionados com as propriedades terapêuticas dos princípios ativos extraídos de plantas e animais (Robbers *et al.*, 1997).

O conjunto de reações químicas que estão ocorrendo continuamente em cada célula é conhecido como metabolismo. A presença de enzimas específicas garante uma certa direção a essas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou simplesmente transformados nessas reações são chamados de metabólitos e as reações enzimáticas envolvidas, respectivamente, são designadas como anabólicas, catabólicas ou de biotransformação (Simões *et al.*, 2000).

Vegetais, microrganismos e, em menor escala, animais, apresentam todo um arsenal metabólico (enzimas, coenzimas e organelas) capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida do organismo produtor, substâncias essas conhecidas como metabólitos secundários. Embora não sendo essenciais para o organismo produtor, os metabólitos secundários garantem

vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (Simões *et al.*, 2000).

Muitas espécies de plantas produzem substâncias ativas quando submetidas a condições de estresse, como uma reduzida disponibilidade de nutrientes no solo, pois em geral o princípio ativo de interesse está associado ao metabolismo secundário da planta que reflete adaptações a condições adversas ou mecanismos de defesa (Coley, 1980).

Embora muitos metabólitos primários (relacionados com os processos essenciais à vida) também sejam de interesse na área farmacêutica, o elevado número e a grande diversidade dos metabólitos secundários vegetais têm despertado o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência que vêem neles uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem (Simões *et al.*, 2000).

Vários são os grupos de substâncias envolvidos com os efeitos biológicos, entre eles podemos destacar os seguintes: óleos voláteis (Schilcher, 1985); polissacarídeos (Favier *et al.*, 1995); compostos fenólicos simples e heterosídicos (Gugliucci, 1996); cumarinas, cromonas e xantonas (Basnet *et al.*, 1994; Ojala *et al.*, 2000); lignanas e neo-lignanas (Pratt *et al.*, 1994); flavonóides (Vijaya *et al.*, 1995); taninos (Burapadaja e Bunchoo, 1995); quinonas (Binutu *et al.*, 1996); heterosídeos cardiotônicos (Kelly e Smith, 1996); saponinas (Akihisa *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 1997); compostos com enxofre (Brabban e Edwards, 1995); alcalóides (Freiburghaus *et al.*, 1996; Keawpradub *et al.*, 1997) e metilxantinas (Stefanovich, 1989).

Os trabalhos publicados sobre as substâncias oriundas de plantas envolvidas com a atividade antimicrobiana têm demonstrado que estas substâncias pertencem, principalmente, aos grupos de compostos fenólicos simples e ácidos fenólicos (Brantner *et al.*, 1996); as quinonas (Binutu *et al.*, 1996); as flavonas, flavonóides e flavonóis (Vijaya *et al.*, 1995); aos taninos (Scalbert, 1991); as cumarinas (Fernandes *et al.*, 1996); aos terpenóides e óleos essenciais (Hufford *et al.*, 1993; Suresh *et al.*, 1997; Wan *et al.*, 1998); aos alcalóides (Freiburghaus *et al.*, 1996); as lecitinas e polipeptídios (Borris, 1996;

Zhang e Lewis, 1997). Outros compostos têm sido relatados pelas suas propriedades antimicrobianas, entre eles destacam-se as poliaminas (em particular a espermidina) (Flayeh e Sulayman, 1987), os isotiocianatos (Iwu *et al.*, 1991), os tiosulfatos (Tada *et al.*, 1988) e os glicosídeos (Murakami *et al.*, 1993).

## **1.7. DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PRODUTOS NATURAIS**

Nos diversos trabalhos que visam demonstrar atividade antibacteriana de produtos naturais são descritos diferentes métodos para detectar tal atividade. Esses métodos não são igualmente sensíveis ou baseados sob o mesmo princípio, como consequência os resultados obtidos também passam a ser profundamente influenciados não somente pelo método selecionado, mas também pelos microrganismos usados para fazer o teste e pelas características de solubilidade de cada substância em estudo (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991).

A escolha dos organismos teste obviamente dependerá grandemente do propósito da investigação, podendo ser usados microrganismos específicos ou representantes de todos os grupos importantes desses. Em qualquer das hipóteses, sempre que o objetivo do estudo for encontrar novos metabólitos secundários ativos contra microrganismos, cepas padrão devem ser usadas para que os resultados possam ser comparados entre os diversos laboratórios de pesquisa. Essas estirpes podem ser adquiridas de diversas coleções de cultura como ATCC (American Type Culture Collection), NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), entre outras. O uso de estirpes bem caracterizadas não é a garantia para uma triagem segura e exata, pois várias precauções devem ser tomadas, como por exemplo cuidados com a manutenção e controle da pureza das culturas (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991).

Crucial para uma investigação de produtos naturais com atividades biológicas é a escolha de bioensaios apropriados para o monitoramento dos efeitos requeridos. Além disso, esses bioensaios devem ser projetados para o uso simultâneo de várias amostras de produtos naturais para facilitar o trabalho de



triagem. Os sistemas-teste devem idealmente ser simples, rápidos, reprodutíveis e baratos. A complexidade dos bioensaios tem que ser planejada em função das instalações, recursos naturais, e disponibilidade de pessoal. A maioria dos laboratórios fitoquímicos engajados na investigação de produtos naturais bioativos não tem facilidades para a realização de testes biológicos sofisticados. Conseqüentemente, esforços têm sido feitos para introduzir bioensaios simples, baratos para uma rápida triagem de extratos e frações contra uma variedade de alvos (Hostettmann *et al.*, 1997).

Os métodos de triagem atualmente disponíveis para detectar atividade antibacteriana de produtos naturais se enquadram dentro de 3 grupos: 1) métodos de difusão; 2) métodos bioautográficos e 3) métodos de diluição. Os ensaios de difusão e bioautográficos são considerados qualitativos, pois apenas mostram se existe ou não atividade antibacteriana nos produtos naturais. Os métodos de diluição podem ser considerados semiquantitativos ou quantitativos. Quando são testadas poucas concentrações do produto natural (geralmente 3 diluições) com a finalidade de detectar seu efeito antibacteriano, o método é dito semiquantitativo. Os testes quantitativos, por sua vez, referem-se àqueles onde se executam diluições seriadas do produto natural e determina-se para este, a concentração inibitória ou bactericida mínima. Todos esses métodos possuem sensibilidades diferentes e adaptações de cada um deles são usadas. Para facilitar a interpretação dos resultados é importante que as adaptações sejam padronizadas.

## 2. JUSTIFICATIVA

Durante as duas décadas passadas, novas doenças infecciosas têm aparecido e algumas infecções que pareciam estar controladas têm reemergido. A previsão é que novos e reemergentes agentes infecciosos continuarão causando sérias ameaças no século XXI. Além disso, a utilidade dos agentes antibacterianos disponíveis está diminuindo rapidamente com o aumento da resistência bacteriana aos antibióticos, a qual apresenta-se como um impasse terapêutico para médicos do mundo inteiro. A necessidade para pesquisas direcionadas ao desenvolvimento de novos antibióticos nunca foi tão grande desde a descoberta dessa classe terapêutica.

Considerando o fracasso na obtenção de novas moléculas com propriedades antimicrobianas a partir de microrganismos, a diversidade química dos produtos naturais, a gama de atividades biológicas atribuídas às substâncias obtidas da natureza e as novas alternativas e tecnologias que aprimoram a descoberta de novas moléculas bioativas, é de extrema importância um aperfeiçoamento das técnicas de triagem de compostos naturais com atividade antibacteriana. A escolha do método a ser usado nas pesquisas realizadas por investigadores parece não considerar as diferenças existentes na sensibilidade dos métodos empregados, uma vez que os trabalhos publicados referentes à atividade antibacteriana de produtos naturais utilizam métodos aleatórios para esta finalidade, dificultando a interpretação e comparação dos resultados. Além disso, percebe-se, na literatura, que mesmo quando os pesquisadores usam o mesmo método, a quantidade de produtos naturais e os microrganismos usados nos testes costumam ser diferentes. Por este motivo, a presente proposta de trabalho visa sugerir recomendações para o uso dos métodos de difusão e bioautografia, estabelecendo critérios para o uso dos mesmos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. OBJETIVO GERAL**

- Avaliar técnicas usadas para triagem de produtos naturais com atividade antibacteriana.

#### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Comparar as variantes do método de difusão em ágar realizadas com o uso de dois tipos diferentes de reservatório: poço feito no ágar e disco de papel impregnado com o produto natural;
- Comparar as variantes direta e indireta do método bioautográfico;
- Estabelecer critérios para o uso desses métodos, considerando as características particulares dos mesmos.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. REAGENTES E MEIOS DE CULTURA**

#### **4.1.1. SOLVENTES USADOS NA SOLUBILIZAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS**

Para dissolver e diluir os produtos naturais estudados foram usados o diclorometano P.A. (Nuclear), o dimetilsulfóxido P.A. (DMSO) (Nuclear) e o etanol P.A. (Grupo Química).

#### **4.1.2. MEIOS DE CULTURA USADOS NOS TESTES COM BACTÉRIA**

Para o crescimento das bactérias e testes de atividade antibacteriana foram usados a infusão de cérebro e coração ("brain heart infusion", BHI), o ágar sangue e o ágar de Mueller-Hinton. Todos os meios de cultura utilizados foram obtidos dos laboratórios Difco.

A infusão de cérebro e coração foi utilizada para manutenção das bactérias e no preparo do inóculo.

O ágar sangue ("Blood Agar Base" adicionada de 5% de hemácias de sangue de carneiro) foi utilizado para testar a pureza das culturas bacterianas.

O ágar de Mueller-Hinton foi usado nos testes de difusão e no teste bioautográfico indireto.

#### **4.1.3. REAGENTE USADO PARA A REVELAÇÃO DOS TESTES**

Para a revelação dos testes de bioautografia foi usada uma solução a 0.2 mg/mL do sal de *p*-iodonitrotetrazolium violeta (INT) (Sigma) em etanol a 70%.

## 4.2. PRODUTOS NATURAIS

Para a realização deste trabalho foram usados 29 extratos, 17 frações obtidas do particionamento e fracionamento cromatográfico de extratos brutos e 9 substâncias puras. Dos 55 produtos naturais estudados, 38 foram obtidos de plantas, 9 de fungos e 8 de um líquen. Os materiais foram gentilmente fornecidos pelos seguintes laboratórios:

- \* Laboratório de Antibióticos da Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Artur Smânia Jr;
- \* Laboratório de Química de Produtos Naturais da Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade do Prof. Moacir Geraldo Pizzolatti;
- \* Laboratório de Pesquisa do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina sob a responsabilidade das Prof<sup>as</sup> Diva Sonaglio, Miriam de Barcellos Falkenberg e Mareni Rocha Farias;
- \* Laboratório de Pesquisa em Química de Produtos Naturais da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul sob a responsabilidade das Prof<sup>as</sup> Sônia Corine Hess, Marize Terezinha Lopes Pereira Peres e Neli Honda.

### 4.2.1. EXTRATOS

Relação dos extratos usados:

- Em acetato de etila:
  - Basidiomas de *Ganoderma anularis*, macerado;
  - Basidiomas de *Ganoderma applanatum*, macerado;
  - Basidiomas de *Ganoderma subamboienense*, macerado.
- Em clorofórmio:
  - Caule de *Baccharis platypoda* (Carqueja), macerado;
  - Basidiomas de *Ganoderma anularis*, macerado;
  - Basidiomas de *Ganoderma subamboienense*, macerado.

- Em hexano:
  - Basidiomas de *Ganoderma subamboienense*, macerado;
  - Caule de *Jatropha weddelliana*, macerado.
  
- Hidroalcoólicos:
  - Folhas e caule de *Baccharis ligustrina* (Carqueja), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Caule de *Baccharis platypoda* (Carqueja), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Caule de *Baccharis pseudotenuifolia* (Carqueja), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Casca de *Croton celtidifolius* (Sangue de Adavi), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas e caule de *Crusia criuva*, teor de etanol de 80%, macerado;
  - Caule de *Cyathea phalerata* (Xaxim), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas de *Eugenia jambolana* (Jambolão), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas de *Eugenia uniflora* (Pitangueira), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas de *Lippia alba* (Erva-cidreira), teor de etanol de 80%, macerado;
  - *Pinpinela* sp (Cravo), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Planta inteira de *Poligala cyparicias*, teor de etanol de 80%, macerado;
  - Planta inteira de *Poligala paniculata*, teor de etanol de 80%, macerado;
  - Planta inteira de *Poligala sabulosa*, teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas e raiz de *Rottboelia cochinchinensis* (Capim camalote), teor alcoólico de 95%, macerado;

- Folhas de *Shinus molle* (Aroeira-vermelha), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas de *Spilanthes olearaceae* (Agrião do Pará), teor de etanol de 80%, macerado;
  - Folhas de *Thelypteris scabra*, teor de etanol de 95%, macerado.
- Em metanol:
    - Basidioma de *Coriopsis polyzona*, macerado;
    - Basidioma de *Ganoderma tornatum*, macerado;
    - Basidioma de *Hexagonia sp*, macerado.

#### 4.2.2. FRAÇÕES

Relação das frações usadas:

- Obtida por cromatografia em coluna:
  - Fração 34-46 do extrato diclorometânico de caules subterrâneos de *Jatropha weddelliana*.
- Obtidas pelo particionamento com:
  - Acetato de etila: extrato hidroalcoólico das folhas de *Lippia alba*, extrato hidroalcoólico da raiz de *Rottboelia cochinchinensis* e casca do caule de *Vochysia divergens*;
  - Butanol: extrato hidroalcoólico das folhas de *Lippia alba*, extrato hidroalcoólico da raiz de *Rottboelia cochinchinensis* e extrato hidroalcoólico de *Thelypteris scabra*;
  - Diclorometano: extrato hidroalcoólico de folhas de *Lippia alba*;
  - Etanol 95%: extrato hidroalcoólico de *Thelypteris scabra*;
  - Éter de petróleo: extrato hidroalcoólico de *Lippia alba*;
  - Hexano: extrato hidroalcoólico da raiz de *Rottboelia cochinchinensis* e extrato hidroalcoólico de *Thelypteris scabra*;

- Metanol/Água (95:5): extrato hidroalcoólico da raiz de *Rottboelia cochinchinensis* e extrato hidroalcoólico de *Thelypteris scabra*.

#### 4.2.3. SUBSTÂNCIAS PURAS

Relação das substâncias puras usadas:

- Ácido 24-hidroxitormêntico.
- Orselinatos de:
  - butila;
  - etila;
  - iso-propila;
  - metila;
  - pentila;
  - propila;
  - sec-butila;
  - terc-butila.

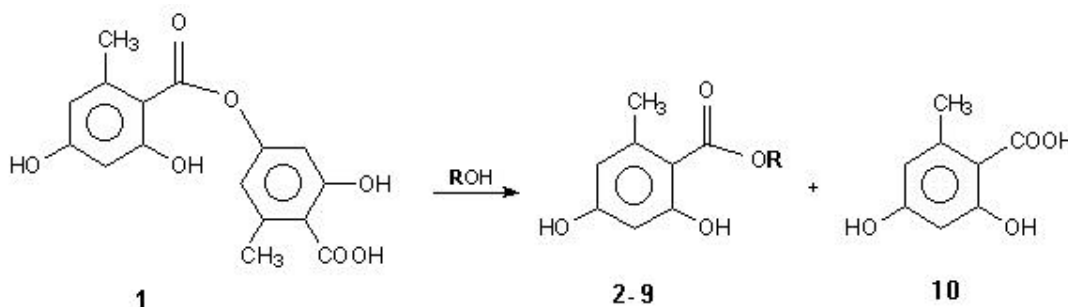
##### 4.2.3.1. Procedimentos experimentais para a obtenção do ácido 24-hidroxitormêntico

O ácido 24-hidroxitormêntico foi isolado da casca do caule de *Vochysia divergens*. Essa substância corresponde à porção insolúvel em metanol do extrato etanólico bruto dessa planta (teor de etanol 95%). A estrutura química desse composto também foi determinada com espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz), RMN-<sup>13</sup>C (75 MHz), IV e massas. O grau de pureza encontrado para essa substância foi de 95%.



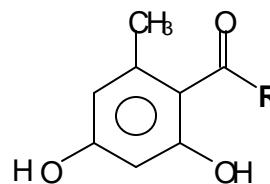
#### 4.2.3.2. Procedimentos experimentais para a obtenção dos orselinatos

O ácido lecanórico (1), através de reações de alcoólise deu origem aos orselinatos **2-9**, os quais estão ilustrados nas Figuras 1 e 2. O ácido lecanórico foi isolado do líquen *Parmotrema tinctorum*, o qual foi coletado na região de Piraputanga no Mato Grosso do Sul em março de 1999 (Figura 1). Esses compostos foram separados em coluna cromatográfica usando gel de sílica como fase estacionária, e clorofórmio como fase móvel. Ácido orselínico **10** foi separado com  $\text{CHCl}_3$ /acetona 93:7 v/v.



**Figura 1** – Reações de alcoólise do ácido lecanórico **1**, produzindo os orselinatos **2-9** e ácido orselínico **10**

| COMPOSTOS                         | R   |
|-----------------------------------|---|
| ORSELINATO DE METILA              | $\text{OCH}_3$                                    |
| ORSELINATO DE ETILA               | $\text{OCH}_2\text{CH}_3$                         |
| ORSELINATO DE PROPILA             | $\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$              |
| ORSELINATO DE BUTILA              | $\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$              |
| ORSELINATO DE PENTILA             | $\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$              |
| ORSELINATO DE <i>ISO</i> -PROPILA | $\text{OCH}(\text{CH}_3)_2$                       |
| ORSELINATO DE <i>SEC</i> -BUTILA  | $\text{OCH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2\text{CH}_3)$ |
| ORSELINATO DE <i>TERC</i> -BUTILA | $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$                        |
| ÁCIDO ORSELÍNICO                  | $\text{OH}$                                       |



**Figura 2** – Estruturas dos orselinatos (**2-9**) e ácido orselínico (**10**)

As substâncias acima citadas tiveram suas estruturas confirmadas com espectro de RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz), RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz), IV e massas.

#### **4.2.4. PREPARO DOS PRODUTOS NATURAIS PARA USO NOS TESTES DE ATIVIDADE ANTIBACTERIANA**

A escolha do solvente usado para dissolver e diluir o produto natural dependeu do método usado na avaliação da atividade do mesmo. No caso em que o solvente manteve contato com a bactéria-teste (difusão em poço) foi usado o dimetilsulfóxido (DMSO) por ser menos tóxico; nos demais casos onde o solvente foi evaporado antes do contato do produto natural com a bactéria, foram usados aqueles mais adequados à dissolução dos mesmos.

Assim, os extratos; frações alcoólicas, hidro-alcoólicas e em acetato de etila e as substâncias puras foram dissolvidas e diluídas com uma mistura de etanol-água (8:2). Os extratos e frações em clorofórmio e em diclorometano foram dissolvidos e diluídos em etanol-diclorometano (8:2) e aqueles extratos e frações em éter de petróleo e em hexano foram dissolvidos e diluídos em etanol-diclorometano (6:4).

#### **4.3. MÉTODOS USADOS PARA DETERMINAR A ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS PRODUTOS NATURAIS AVALIADOS NESSE ESTUDO**

Para sugerir metodologias para triagem de produtos naturais com atividade antibacteriana, foram avaliadas duas variantes do método de difusão em gel: com poços realizados no ágar e com discos de papel filtro impregnados com produtos naturais e duas variantes do método bioautográfico: direta (sem difusão para o ágar) e indireta (com difusão para o ágar).

##### **4.3.1. ORGANISMOS TESTE**

A atividade antibacteriana dos produtos naturais, descritos no item 4.2, foi testada contra duas espécies de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) e *Escherichia coli* ATCC 25922, as quais vem sendo mantidas em BHI a  $\pm$  -20°C. Para a realização dos

testes, transferiu-se 300 $\mu$ L de cada cultura-estoque para 3 mL de caldo BHI. A incubação foi mantida por 24h a 36°C  $\pm$ 1°C e a pureza foi testada após 8h da incubação inicial. Após a incubação, a suspensão bacteriana foi diluída em solução fisiológica estéril para a realização dos testes de difusão em gel e bioautografia indireta e, no próprio caldo BHI, para a realização do teste bioautográfico direto. No primeiro caso, a concentração de organismos foi ajustada à turvação correspondente a do tubo 0.5 da escala de Mc Farland ( $10^8$  ufc/mL). Para o teste de bioautografia direta a mesma foi ajustada para aproximadamente  $10^9$  ufc/mL, turvação equivalente àquela do tubo nº3 da escala de Mc Farland.

#### **4.3.2. MÉTODO DE DIFUSÃO EM GEL**

##### **4.3.2.1. Variante poço**

O inóculo bacteriano, preparado como descrito no item 4.3.1, foi semeado na superfície do ágar de Mueller-Hinton (18 mL de meio distribuído em placas de Petri de 9 cm de diâmetro) com auxílio de swab estéril. Os produtos naturais foram dissolvidos e diluídos em DMSO, como já mencionado no item 4.2.4. Foram preparadas 9 diluições dos extratos e das frações (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5, 2.5 e 1.25 mg/mL) e 4 diluições das substâncias puras (20, 15, 10 e 5 mg/mL). Os produtos naturais (50 $\mu$ L) foram aplicados diretamente em orifícios de 7 mm de diâmetro feitos no ágar com auxílio de um furador de aço estéril. Foi deixado um afastamento mínimo de 20mm entre os poços e foram realizados no máximo 5 poços por placa. Os sistemas foram incubados por 24h a 36°C  $\pm$ 1°C, em estufa bacteriológica (Fanem) e em condições aeróbicas. Após a incubação as placas foram observadas quanto à homogeneidade do crescimento bacteriano e nos casos em que foi verificada inibição do crescimento, o diâmetro do halo foi medido em milímetros. Como controles foram usados discos comerciais impregnados com 30 $\mu$ g de cloranfenicol (Cecon<sup>®</sup>) e o veículo no qual foi diluído o produto natural (50 $\mu$ L). Os testes foram realizados em duplicata.

#### 4.3.2.1.1. Triagem dos produtos naturais

Todos os 55 produtos naturais foram usados no teste de triagem. Para isso, cinco miligramas (5 mg) de extratos e frações e um miligrama (1 mg) de substâncias puras foram aplicados em orifícios feitos no ágar. Todos os produtos naturais foram veiculados em cinquenta microlitros (50µL) de dimetilsulfóxido (DMSO). Os produtos naturais que, após a incubação, inibiram o crescimento bacteriano originando halos maior ou igual a 9 mm foram selecionados para dar prosseguimento ao presente trabalho.

#### 4.3.2.2. Variante disco

##### 4.3.2.2.1. Aplicação dos produtos naturais nos discos de papel filtro

Os produtos naturais que demonstraram atividade antibacteriana nos testes de triagem realizados (item 4.3.2.1.1) foram dissolvidos e diluídos nos reagentes já mencionados no item 4.2.4. Foi preparado o mesmo número de diluições dos extratos, frações e substâncias puras descrito no método com poços feitos no ágar, no entanto, partiu-se de concentrações 2.5 vezes superiores (250 mg/mL para extratos e frações e 50 mg/mL para as substâncias puras). Discos de papel filtro (Whatman, nº3) com diâmetro de 7 mm foram impregnados com 20µL de cada uma das diluições. Os discos foram deixados à temperatura ambiente até evaporação do diluente e mantidos em geladeira até o momento do uso.

##### 4.3.2.2.2. Procedimentos

Para a realização deste teste, o ágar de Mueller-Hinton foi preparado conforme especificado no item anterior, entretanto, os produtos naturais foram aplicados diretamente nos discos de papel e não nos orifícios feitos no ágar. Assim, em cada placa foram aplicados no máximo 5 discos.

Discos comerciais de cloranfenicol (30 $\mu$ g) e discos de papel impregnados com 20 $\mu$ L dos diluentes dos produtos naturais foram usados como controles. Os testes foram realizados em duplicata.

### **4.3.3. MÉTODO BIOAUTOGRÁFICO**

#### **4.3.3.1. Variante direta (sem difusão para o ágar)**

A variante direta do método bioautográfico desenvolvida neste trabalho pode ser resumida em quatro etapas gerais: 1) preparação e aplicação dos produtos naturais em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (gel de sílica G60 F<sub>254</sub>, Merck); 2) preparação e aplicação do inóculo bacteriano nas placas de CCD; 3) incubação dos sistemas e 4) revelação do crescimento bacteriano e leitura dos halos de inibição do crescimento.

Na primeira etapa, 10 $\mu$ L dos extratos, frações e substâncias puras veiculadas nos solventes descritos no item 4.2.4 foram aplicados nas placas de CCD em volumes finais correspondentes a 400, 200 e 100 $\mu$ g, respectivamente. Os produtos naturais que demonstraram atividade nessas quantidades foram diluídos às concentrações que variaram de 400 a 50 $\mu$ g para os extratos, 200 a 25 $\mu$ g para as frações e 100 a 12.5 $\mu$ g para as substâncias puras. Foram deixados espaços de 2 cm entre os pontos de aplicação e entre esses e as margens da placa de CCD. Todas as aplicações foram realizadas com micropipeta, de modo que o diâmetro do ponto de aplicação ficou em torno de 4 mm. Para cada teste foi usada uma placa de CCD 6 x 6 cm e foram aplicados 4 produtos-teste. Vinte  $\mu$ g (10 $\mu$ L) do antibiótico cloranfenicol e 10 $\mu$ L dos solventes usados foram aplicados nas placas como controle.

Na etapa 2, o inóculo foi preparado conforme descrito no item 4.3.1 e transferido para placa de Petri estéril. As placas de CCD, com os produtos naturais aplicados, foram submersas na suspensão bacteriana aonde foram mantidas por 5 segundos. Após repetir esta ação o excesso da suspensão foi

escorrido e a placa de CCD alojada no interior de outra placa de Petri estéril, devidamente identificada.

Na terceira etapa, os sistemas foram incubados por 24h a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  no interior de uma caixa plástica (polietileno), com tampa hermeticamente fechada, contendo 24 cm de largura, 35 cm de comprimento e 15 cm de altura. Ao lado das placas foi depositado um Becker contendo algodão embebido em água para manter a umidade.

A última etapa correspondeu à revelação das placas de CCD com solução de sal de *p*-iodonitrotetrazolium violeta (INT) descrita no item 4.1. Cada placa de CCD foi borrifada com 1 mL da solução. As placas foram incubadas por mais 4 horas e os halos de inibição do crescimento foram observados e mensurados em milímetros (mm) de hora em hora.

Tendo em vista as variações encontradas na literatura para o desenvolvimento da variante direta do método bioautográfico foram realizados testes com *S. aureus* crescidos 24 e 48 horas e com três concentrações diferentes do revelador para estabelecer as condições apropriadas para a execução desse método. Os testes com o inóculo bacteriano foram realizados em triplicata.

#### **4.3.3.2. Variante indireta (com difusão para o ágar)**

A primeira etapa deste ensaio foi realizada da mesma forma que o ensaio bioautográfico direto. Na segunda etapa, as placas de CCD foram recobertas com uma camada de ágar de Mueller-Hinton (9 mL para cada placa de Petri com 9 cm de diâmetro), sendo que o contato da suspensão bacteriana com os produtos naturais foi feito de duas formas distintas: misturado com o ágar e semeado com “swab”. No primeiro caso, 100 $\mu\text{L}$  das suspensões dos organismos-teste foram misturados com 9 mL do ágar, sendo o mesmo despejado cuidadosamente sobre a placa de CCD. No segundo caso, o inóculo não foi misturado com o ágar, mas foi espalhado na superfície do mesmo como descrito no item 4.5.2. Apenas os extratos dos produtos naturais submetidos a este teste foram avaliados com os

dois tipos de inóculo bacteriano e os experimentos foram realizados em duplicata. Para a comparação entre as duas variantes do método bioautográfico foram considerados apenas os resultados obtidos com o uso da técnica em que a suspensão bacteriana foi misturada com o ágar ("Pour Plate").

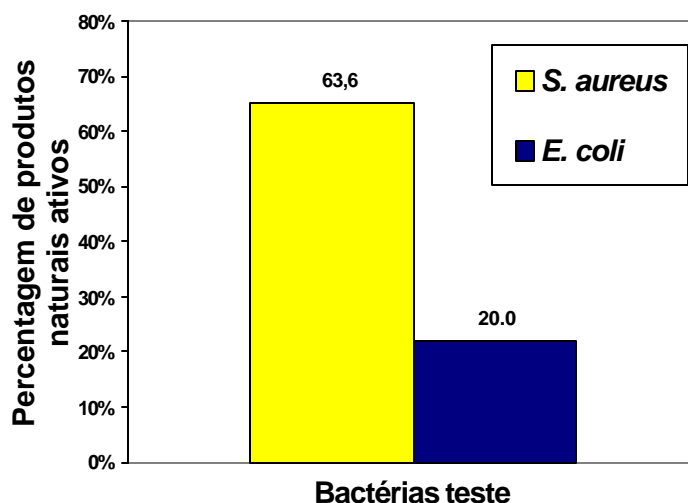
#### **4.4. COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DOS MÉTODOS ESTUDADOS**

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias (EPM) dos diâmetros dos halos de inibição obtidos com os produtos naturais que possuíam quantidades suficientes para a realização de repetições dos testes. As diferenças estatísticas entre as duas variantes dos métodos de difusão e entre as duas variantes dos métodos bioautográficos foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Duncan quando pertinente. O t-teste foi usado na comparação dos resultados encontrados com o uso da variante direta do método de bioautografia realizada com *S. aureus* crescidos por 24 e 48 horas e com o uso da variante indireta do método de bioautografia realizada com dois tipos de inóculos. Valores de p menores que 0.05 ( $p < 0.05$ ) foram considerados significativos.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. TRIAGEM DOS PRODUTOS NATURAIS

Vinte e nove (29) extratos, dezessete (17) frações e nove (9) substâncias puras, provenientes de dezenove (19) plantas, seis (6) fungos fitopatogênicos e um (1) líquen, foram usados neste trabalho para determinar suas propriedades antimicrobianas contra duas espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Dos 55 produtos naturais avaliados neste estudo, 35 inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (63.6%) e 11 inibiram o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (20%), demonstrando que o efeito contra a espécie Gram-positiva foi mais pronunciado que aquele contra a espécie Gram-negativa (Figura 3). Dos 11 produtos naturais que inibiram o crescimento de *E. coli*, 10 inibiram também o crescimento de *S. aureus*. Embora 36 dos produtos naturais usados fossem ativos contra pelo menos uma espécie bacteriana, as etapas seguintes foram desenvolvidas com apenas 29 deles, pois além dos dezenove (19) que não foram ativos, sete (7) não tinham quantidades suficientes para a continuidade dos testes.



**Figura 3** – Espectro antibacteriano dos produtos naturais que demonstraram atividade nos testes de triagem



A diferença encontrada na sensibilidade das duas espécies testadas aos produtos naturais se deve provavelmente as diferenças existentes na composição celular de bactérias Gram -positivas e Gram-negativas (Grosvenor *et al.*, 1995).

Vanden Berghe e Vlietinck (1991) alertam para a ação inespecífica de extratos contra bactérias devido ao efeito sinérgico de vários componentes da planta. Segundo esses autores, extratos com atividade inibitória contra uma ou várias bactérias não prediz necessariamente um efeito seletivo ou de amplo espectro, respectivamente. A potência das substâncias ativas somente pode ser determinada quando testadas isoladamente e usando uma metodologia padronizada.

Conforme era esperado, os resultados apresentados na tabela 2 mostram que as substâncias puras foram os produtos naturais que apresentaram maior efeito contra as duas espécies de bactérias usadas (88,9%). Por outro lado, as frações testadas contra a *E. coli* foram menos ativas do que os extratos brutos. Deve ser enfatizado que esta comparação tem pouco valor uma vez que as frações inativas não foram derivadas dos extratos ativos. As substâncias puras testadas demonstraram ser promissoras e mais estudos devem ser realizados.

Além de diferenças nas porcentagens de inibição entre os dois microrganismos testados, foi ainda observado diferenças entre os tamanhos dos halos de inibição do crescimento bacteriano. Para *S. aureus* o diâmetro médio de inibição foi de 14,9 mm (EPM 0,8) e para *E. coli* 12,0 mm (EPM 0,5). Em ambos os casos consideraram-se apenas os halos de inibição produzidos pelos produtos naturais ativos. Em muitos estudos que constam resultados referentes à atividade antibacteriana de produtos naturais pelo método de difusão em ágar, o diâmetro do halo de inibição tem sido usado como fator classificatório do efeito antibacteriano encontrado, isto é, dependendo do diâmetro do halo de inibição obtido, os extratos são classificados por faixas como tendo boa, moderada, fraca, muito fraca ou nenhuma atividade (Ojala *et al.*, 2000; Ali *et al.*, 2001). Muitos autores ainda comparam as zonas de inibição de crescimento de extratos de produtos naturais com aquelas obtidas por antibióticos referência (Ieven *et al.*, 1979). Vanden Berghe e Vlietinck (1991) não recomendam essas comparações para estimar a potência antimicrobiana de produtos naturais.

Nesse sentido, cabe colocar que o diâmetro do halo de inibição está primariamente relacionado à polaridade da substância inibidora. Compostos apolares tendem a difundir menos a partir do ponto de aplicação para o meio de cultura do que compostos polares. Assim, substâncias apolares com grande efeito antibacteriano podem originar halos de inibição pequenos em função da dificuldade encontrada na difusão das moléculas. Portanto, não seria válido comparar, até mesmo, o diâmetro do halo de inibição produzido por substâncias puras com aqueles originados por antibióticos referência (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991). Outro fator importante que deve ser sempre lembrado quando se trabalha com extratos brutos é a concentração da substância ativa. Uma grande zona de inibição pode ser causada por uma substância altamente ativa presente em pequena quantidade ou por uma substância com baixa atividade, mas presente em alta concentração no extrato. Essas observações são suficientes para assegurarem que não há uma relação universal entre o tamanho do halo de inibição e potência antimicrobiana. Porém, deve ser enfatizado que não se está colocando em dúvida os critérios de interpretação para os testes de difusão com o uso de antibióticos comerciais, uma vez que para cada antibiótico usado clinicamente existe um valor de “breakpoint” pré-estabelecido (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991).

Os valores de “breakpoint” são definidos considerando as diferenças no processo de difusão dos antibióticos e correlacionando os halos de inibição com a concentração inibitória mínima (CIM) obtida pelo método de diluição. O uso de valores de “breakpoints” permite a classificação de cepas dentro de grupos com base nos resultados do teste laboratorial. Para antibióticos solúveis em água, os resultados de um teste de difusão podem corresponder àqueles obtidos por um teste de diluição. O diâmetro da zona de inibição seria então inversamente proporcional à CIM, ao passo que uma CIM apropriada poderia ser extrapolada a partir do diâmetro da zona (Washington, 1988). Os termos resistente e sensível providenciam o significado clínico para os resultados gerados pelos testes de sensibilidade. Apesar de considerado o método padrão, os valores de “breakpoint” são problemáticos até hoje (McCabe e Treadwell, 1986; Piddock, 1990). O próprio NCCLS que apresenta vários “breakpoints” não tem publicado o método pelo qual estes foram estimados (Digranes e Melby, 1997).

**Tabela 2** – Caracterização dos produtos naturais usados e valores dos respectivos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos

| Amostras<br>(Nome científico)      | Parte usada    | Solvente<br>Extrator | Origem | Halo de inibição de<br>crescimento |                |
|------------------------------------|----------------|----------------------|--------|------------------------------------|----------------|
|                                    |                |                      |        | <i>S. aureus</i>                   | <i>E. coli</i> |
| <b><u>Extratos</u><sup>a</sup></b> |                |                      |        |                                    |                |
| <i>Baccharis ligustrina</i>        | Folhas/Caule   | Etanol 80%           | Planta | 23 <sup>b</sup>                    | 0              |
| <i>Baccharis platypoda</i>         | Caule          | Clorofórmio          | Planta | 17                                 | 0              |
|                                    |                | Etanol 80%           |        | 27                                 | 0              |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i>  | Caule          | Etanol 80%           | Planta | 15                                 | 0              |
| <i>Coriopsis polyzona</i>          | Basidioma      | Metanol              | Fungo  | 0                                  | 0              |
| <i>Croton celtidifolius</i>        | Casca de caule | Etanol 80%           | Planta | 20                                 | 15             |
| <i>Crusia criuva</i>               | Folhas/Caule   | Etanol 80%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <i>Cyathaea phalerata</i>          | Caule          | Etanol 80%           | Planta | 15                                 | 9              |
| <i>Eugenia jambolana</i>           | Folhas         | Etanol 80%           | Planta | 19                                 | 13             |
| <i>Eugenia uniflora</i>            | Folhas         | Etanol 80%           | Planta | 17                                 | 0              |
| <i>Ganoderma anularis</i>          | Basidioma      | Acetato de etila     | Fungo  | 9                                  | 11             |
|                                    |                | Clorofórmio          |        | 9                                  | 0              |
| <i>Ganoderma applanatum</i>        | Basidioma      | Acetato de etila     | Fungo  | 11                                 | 11             |
| <i>Ganoderma subamboinense</i>     | Basidioma      | Acetato de etila     | Fungo  | 0                                  | 11             |
|                                    |                | Clorofórmio          |        | 0                                  | 0              |
|                                    |                | Hexano               |        | 11                                 | 9              |
| <i>Ganoderma tornatum</i>          | Basidioma      | Metanol              | Fungo  | 0                                  | 0              |
| <i>Hexagonia sp</i>                | Basidioma      | Metanol              | Fungo  | 0                                  | 0              |
| <i>Jatropha weddelliana</i>        | Caule          | Hexano               | Planta | 17                                 | 0              |
| <i>Lippia alba</i>                 | Folhas         | Etanol 90%           | Planta | 11                                 | 0              |
| <i>Pinpinela sp</i>                | Partes aéreas  | Etanol 80%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <i>Polygala cyparicias</i>         | Planta inteira | Etanol 80%           | Planta | 9                                  | 0              |
| <i>Polygala paniculata</i>         | Planta inteira | Etanol 80%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <i>Polygala sabulosa</i>           | Planta inteira | Etanol 80%           | Planta | 11                                 | 0              |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i>  | Folhas         | Etanol 95%           | Planta | 0                                  | 0              |
|                                    | Raiz           | Etanol 95%           |        | 10                                 | 0              |
| <i>Shinus molle</i>                | Folhas         | Etanol 80%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <i>Spilanthes olearaceae</i>       | Folhas         | Etanol 80%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <i>Thelypteris scabra</i>          | Folhas         | Etanol 95%           | Planta | 0                                  | 0              |
| <b><u>Frações</u></b>              |                |                      |        |                                    |                |
| <i>Jatropha weddelliana</i>        | Caule          | Diclorometano        | Planta | 12                                 | 0              |
| <i>Lippia alba</i>                 | Folhas         | Acetato de etila     | Planta | 18                                 | 0              |
|                                    |                | Butanol              |        | 15                                 | 0              |
|                                    |                | Diclorometano        |        | 11                                 | 0              |
|                                    |                | Éter de petróleo     |        | 15                                 | 0              |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i>  | Folhas         | Butanol              | Planta | 0                                  | 0              |
|                                    |                | Hexano               |        | 12                                 | 0              |
|                                    |                | Metanol/Água         |        | 0                                  | 0              |
|                                    | Raiz           | Acetato de etila     |        | 21                                 | 0              |
|                                    |                | Hexano               |        | 10                                 | 0              |
|                                    |                | Metanol/Água         |        | 0                                  | 0              |
| <i>Thelypteris scabra</i>          | Folhas         | Butanol              | Planta | 0                                  | 0              |
|                                    |                | Clorofórmio          |        | 10                                 | 0              |
|                                    |                | Etanol               |        | 0                                  | 0              |
|                                    |                | Hexano               |        | 0                                  | 0              |
|                                    |                | Metanol/Água         |        | 0                                  | 0              |
| <i>Vochysia divergens</i>          | Casca de caule | Acetato de etila     | Planta | 12                                 | 0              |
| <b><u>Substâncias puras</u></b>    |                |                      |        |                                    |                |
| Orselinato de butila               | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 17                                 | 0              |
| Orselinato de etila                | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 13                                 | 11             |
| Orselinato de iso-propila          | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 18                                 | 19             |
| Orselinato de metila               | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 16                                 | 12             |
| Orselinato de propila              | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 11                                 | 0              |
| Orselinato de pentila              | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 22                                 | 0              |
| Orselinato de sec-butila           | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 24                                 | 11             |
| Orselinato de terc-butila          | Líquen inteiro | - <sup>c</sup>       | Líquen | 0                                  | 0              |
| Ácido 24-hidroxitormêntico         | Casca do caule | - <sup>c</sup>       | Planta | 13                                 | 0              |

<sup>a</sup> Foram usados 5 mg de extratos e frações e 1 mg de substâncias puras.

<sup>b</sup> Valores expressos em milímetros.

<sup>c</sup> Conforme descrito na metodologia.

No presente estudo, a atividade antibacteriana dos produtos naturais foi determinada pela leitura do diâmetro da zona de inibição de crescimento bacteriano, como mostrado na tabela 2. Os diâmetros iguais ou superiores a nove (9) milímetros (mm) foram considerados como suficientes para indicar atividade antibacteriana dos produtos naturais usados, uma vez que esses foram aplicados em poços ou discos de diâmetro equivalente a 7 mm.

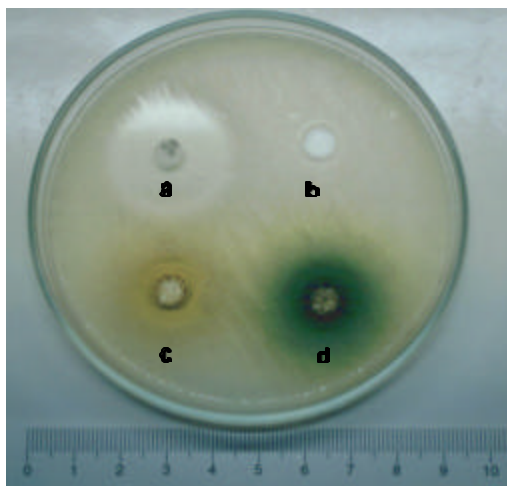
Como foram usadas amostras de plantas, fungos e de um líquen oriundas de uma única coleta, a potência da atividade antibacteriana observada é representativa dessa condição. Outros resultados poderiam ter sido obtidos se as coletas das mesmas amostras tivessem ocorrido em outros momentos, uma vez que, segundo Alves e Pavani (1991) e Nimri e colaboradores (1999), a concentração dos constituintes nesses seres vivos pode sofrer mudanças devido à influência de vários fatores, inclusive com a época da coleta.

## **5.2. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DAS VARIANTES DO MÉTODO DE DIFUSÃO EM GEL**

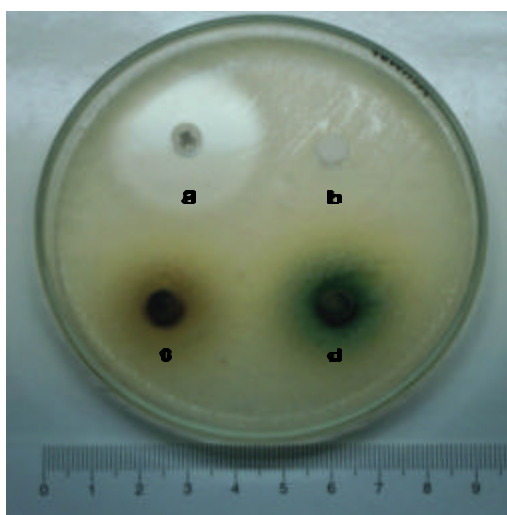
Para sugerir critérios a serem adotados na avaliação do potencial antimicrobiano de produtos naturais, pelo método de difusão, 14 extratos, 7 frações e 8 substâncias foram testadas em concentrações que variaram de 0,0625 a 5 mg contra as espécies bacterianas que mostraram sensibilidade no teste de triagem.

Os sistemas-teste que foram usados neste trabalho para a realização do método de difusão variantes poço e disco estão ilustrados nas figuras 4 e 5, respectivamente. Discos comerciais impregnados com 30 µg de cloranfenicol foram usados como controle positivo e o solvente usado na dissolução dos produtos naturais como controle negativo. O controle positivo permite avaliar se os procedimentos empregados durante a realização do experimento foram adequados, inclusive se a bactéria-teste está mantendo o seu perfil de sensibilidade de acordo com os descritos na literatura (Murray *et al.*, 1999). Quando se utilizam solventes diferentes de água para dissolver os produtos naturais, o que é muito comum, é necessário que os mesmos sejam testados

simultaneamente com os produtos naturais para eliminar a possibilidade de atividade antibacteriana do solvente (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991). Nos nossos experimentos os solventes usados não inibiram o crescimento das duas espécies bacterianas empregadas. Uma das vantagens dos métodos de difusão é que eles permitem que se teste até cinco compostos por placa contra uma espécie bacteriana.



**Figura 4** – Modelo de sistema teste usado para o método de difusão variante poço. a. controle positivo (disco de 30 $\mu$ g de cloranfenicol); b, controle negativo (solvente no qual foi dissolvido o produto natural); c e d, extratos avaliados



**Figura 5** – Modelo de sistema teste usado para o método de difusão variante disco. a. controle positivo (disco de 30 $\mu$ g de cloranfenicol); b, controle negativo (solvente no qual foi dissolvido o produto natural); c e d, extratos avaliados

Conforme pode ser observado na tabela 3, dos 14 extratos testados pelas duas variantes do método de difusão em ágar empregadas neste trabalho, nove (64.3%) proporcionaram halos maiores de inibição de crescimento da bactéria *S. aureus* quando foram aplicados em poços, GL(28,29);  $F=36,06$ ;  $p<0.01$ . No estudo estatístico foram usados os resultados obtidos com o uso de 5 mg dos extratos. Os demais cinco extratos não apresentaram diferenças significativas entre as variantes do método de difusão para o grau de significância adotado. Da mesma forma, quatro frações (57.1%), das sete frações usadas, demonstraram diferenças significativas [GL(14,15);  $F=11,83$ ;  $p<0.01$ ] nas medidas dos halos de inibição do *S. aureus* entre as duas variantes empregadas, considerando-se também, em ambas as variantes, a maior concentração testada (5 mg). Para as substâncias puras não foi possível a realização de repetições devido a pouca quantidade de material, sendo assim, não foi realizada a comparação estatística para cada substância pura isoladamente. Porém, a simples observação dos dados apresentados na tabela 3 é suficiente para constatar que o método de difusão variante poço proporcionou halos de inibição maiores que quando as substâncias foram aplicadas em discos.

Nas figuras 6, 7, 8 e 9 estão apresentadas as diferenças encontradas entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição do *S. aureus*, obtidas nas duas variantes do método de difusão em ágar, para os extratos, frações, substâncias puras e para o conjunto de todos os produtos naturais testados, respectivamente. O controle representa o diâmetro dos discos e poços usados que, em ambas as variantes do método de difusão foi de sete (7) mm, como descrito na metodologia. Na análise estatística, cada controle (poço e disco) foi considerado um tratamento, porém, nas figuras, os dois controles estão representados numa única barra por possuírem o mesmo valor.

**Tabela 3** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, obtidas nos testes de difusão, variante poço e variante disco, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais

| Amostra  | Concentração (mg/poço ou disco) |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |     |     |    |      |    |       |   |        |   |
|--|---------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------|-----|-----|----|------|----|-------|---|--------|---|
|  | 5                               |    | 4  |    | 3  |    | 2  |    | 1  |    | 0.75 |     | 0.5 |    | 0.25 |    | 0.125 |   | 0.0625 |   |
|  | P <sup>a</sup>                  | D  | P  | D  | P  | D  | P  | D  | P  | D  | P    | D   | P   | D  | P    | D  | P     | D | P      | D |
| <b>Extratos</b>  |                                 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |     |     |    |      |    |       |   |        |   |
| <i>Baccharis ligustrina</i> (extrato em etanol)        | 22 <sup>b</sup>                 | 12 | 19 | 11 | 16 | 10 | 14 | 10 | 12 | 9  | _NT  | _NT | 11  | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Baccharis platipode</i> (extrato em clorofórmio)    | 12                              | 0  | 12 | 0  | 12 | 0  | 11 | 0  | 10 | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato em etanol)         | 22                              | 11 | 19 | 11 | 18 | 10 | 17 | 9  | 16 | 9  | -    | -   | 10  | 0  | 9    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> (extrato em etanol)  | 16                              | 12 | 14 | 11 | 13 | 11 | 13 | 10 | 11 | 9  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Croton celtidifolius</i> (extrato em etanol)        | 23                              | 16 | 22 | 15 | 20 | 14 | 20 | 13 | 16 | 11 | -    | -   | 12  | 9  | 11   | 0  | 9     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Cyathea phalerata</i>                               | 17                              | 11 | 16 | 11 | 15 | 10 | 14 | 9  | 13 | 9  | -    | -   | 11  | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Eugenia jambolana</i> (extrato em etanol)           | 20                              | 15 | 19 | 13 | 18 | 12 | 16 | 11 | 14 | 9  | -    | -   | 13  | 0  | 13   | 0  | 12    | 0 | 9      | 0 |
| <i>Eugenia uniflora</i> (extrato em etanol)            | 21                              | 18 | 20 | 17 | 19 | 17 | 18 | 15 | 16 | 14 | -    | -   | 14  | 12 | 12   | 10 | 9     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato acetato de etila)   | 10                              | 9  | 10 | 0  | 9  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato em clorofórmio)     | 10                              | 0  | 9  | 0  | 9  | 0  | 9  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Lippia alba</i> (extrato em etanol)                 | 18                              | 20 | 17 | 19 | 16 | 17 | 15 | 12 | 11 | 9  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Polygala cyparicias</i> (extrato em etanol)         | 10                              | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Polygala sabulosa</i> (extrato em etanol)           | 12                              | 0  | 11 | 0  | 10 | 0  | 10 | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i> (extrato em etanol)  | 10                              | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <b>Frações</b>   |                                 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |      |     |     |    |      |    |       |   |        |   |
| <i>Lippia alba</i> (fração em acetato de etila)        | 18                              | 14 | 18 | 14 | 16 | 12 | 14 | 11 | 11 | 10 | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Lippia alba</i> (fração em butanol)                 | 18                              | 13 | 17 | 13 | 15 | 12 | 13 | 10 | 10 | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Lippia alba</i> (fração em diclorometano)           | 11                              | 9  | 10 | 9  | 10 | 0  | 9  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Lippia alba</i> (fração em éter de petróleo)        | 12                              | 12 | 12 | 12 | 11 | 11 | 11 | 11 | 9  | 10 | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>R. cochinchinensis</i> (fração acet. Etila da raiz) | 18                              | 11 | 17 | 10 | 15 | 9  | 14 | 0  | 9  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>R. cochinchinensis</i> (fração hexano da raiz)      | 10                              | 10 | 9  | 9  | 9  | 0  | 0  | 0  | 0  | 0  | -    | -   | 0   | 0  | 0    | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |
| <i>Vochysia divergens</i> (fração acetato de etila)    | 13                              | 0  | 12 | 0  | 12 | 0  | 12 | 0  | 12 | 0  | -    | -   | 12  | 0  | 10   | 0  | 0     | 0 | 0      | 0 |

Continuação tabela 3

| <b>Substâncias puras<sup>c</sup></b> |     |     |     |     |     |     |     |     |    |    |    |    |    |    |    |    |     |     |     |     |
|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| Orselinato de butila                 | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 13 | 18 | 12 | _NT | _NT | _NT | _NT |
| Orselinato de etila                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 15 | 9  | 14 | 9  | 14 | 9  | 10 | 9  | -   | -   | -   | -   |
| Orselinato de iso-propila            | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 23 | 11 | 23 | 11 | 23 | 11 | 20 | 10 | -   | -   | -   | -   |
| Orselinato de metila                 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 20 | 12 | 18 | 11 | 14 | 11 | 0  | 11 | -   | -   | -   | -   |
| Orselinato de pentila                | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 22 | 16 | 22 | 16 | 22 | 16 | 22 | 16 | -   | -   | -   | -   |
| Orselinato de propila                | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 12 | 10 | 12 | 10 | 12 | 10 | 12 | 10 | -   | -   | -   | -   |
| Orselinato de sec-butila             | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 24 | 18 | 24 | 18 | 24 | 18 | 24 | 17 | -   | -   | -   | -   |
| Ácido 24-hidroxi tormêntico          | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 13 | 0  | 12 | 0  | 11 | 0  | 9  | 0  | -   | -   | -   | -   |

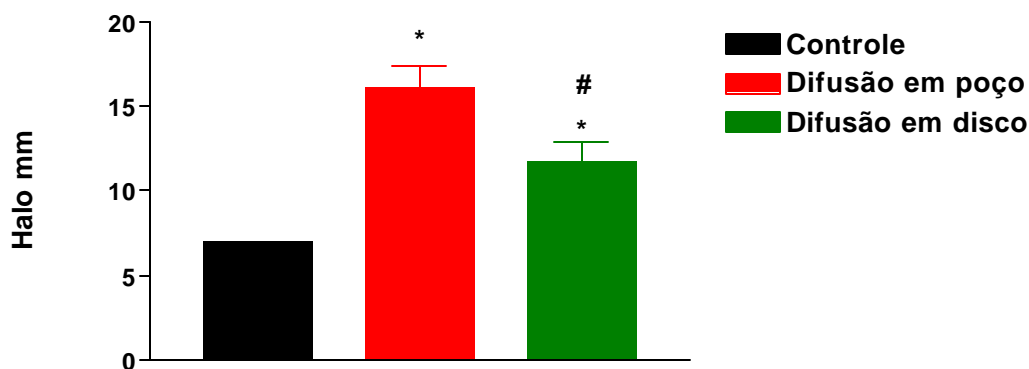
<sup>a</sup> P = Método de difusão variante poço; D = Método de difusão variante disco.

<sup>b</sup> Valor expresso em milímetros.

<sup>c</sup> Para as substâncias puras não foram realizadas repetições, sendo os resultados mostrados representativos de determinações individuais.

<sup>NT</sup> Não testado.

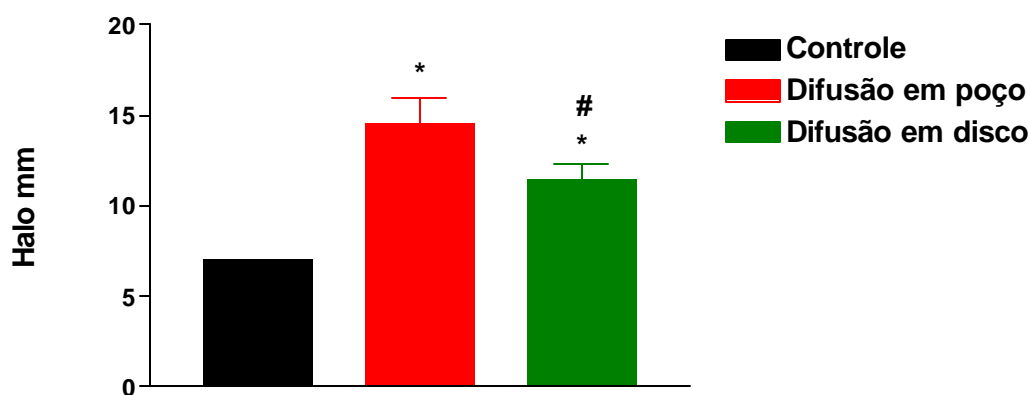




**Figura 6** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso dos extratos testados (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão GL(3,52);  $F=23,03$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

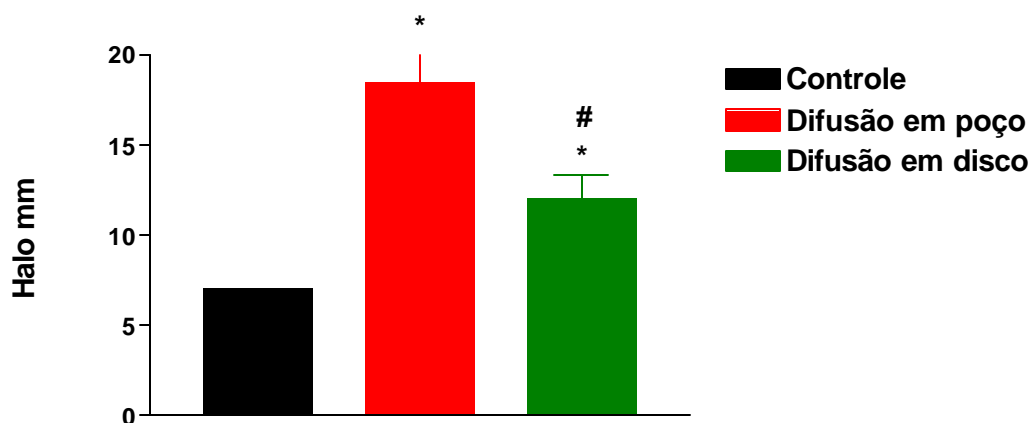
# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 7** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso das frações testadas (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão GL(3,24);  $F=19,50$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

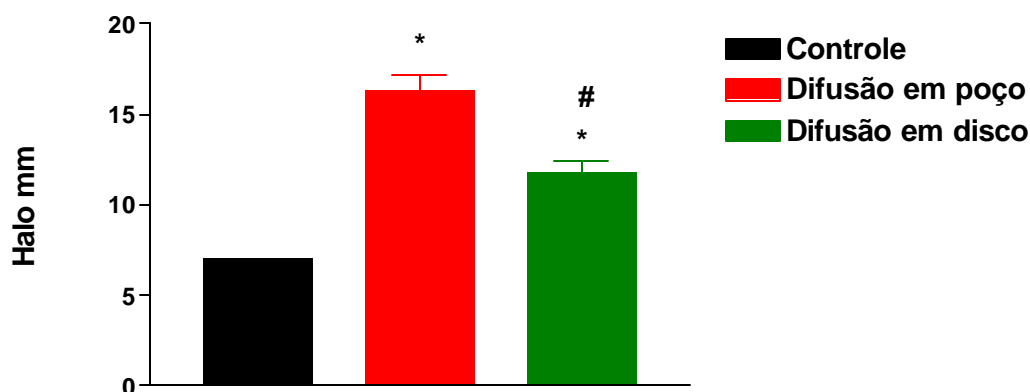
# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 8** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso das substâncias puras testadas (1 mg) pelas duas variantes do método de difusão GL(3,28);  $F=27,81$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 9** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método de difusão, GL(3,112);  $F=63,88$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.

Na análise geral dos halos de inibição de crescimento da bactéria *Escherichia coli* pelos produtos naturais usados, verificou-se, do mesmo modo como já havia sido observado para o *S. aureus*, que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) entre as duas variantes do método de difusão empregadas, sendo o

método de difusão variante poço novamente mais sensível que o método de difusão variante disco de papel filtro impregnado com os produtos naturais (Tabela 4).

Dos produtos naturais usados contra a *E. coli* (4 extratos e 4 substâncias puras), todos (100%) proporcionaram halos de inibição de crescimento maiores quando foram dispostos em poços para o grau de significância mencionado acima. Nas duas situações considerou-se as maiores concentrações usadas, 5 e 1 mg, respectivamente.

Com as mesmas concentrações dos produtos naturais em ambas as variantes do método de difusão, os diâmetros dos halos de inibição de crescimento na variante poço, de um modo geral, foram maiores que aqueles obtidos na variante disco (Tabelas 3 e 4). Além disso, dos 29 produtos naturais usados contra o *S. aureus*, todos (100%) demonstraram atividade quando testados pela variante poço do método de difusão, entretanto, apenas 22 deles (75,9%) apresentaram efeito sobre o crescimento da mesma bactéria pela variante disco desse método, para as concentrações de 5 mg para os extratos e frações e 1 mg para as substâncias puras (Tabela 3). Resultados com diferenças maiores entre as variantes foram observados para os testes contra a *E. coli*. Dos oito (8) produtos naturais usados contra essa bactéria, 100% foram ativos pelo método de difusão variante poço, enquanto somente um produto natural (12,5%) demonstrou efeito inibitório pelo método de difusão com o uso de disco, para as concentrações de 5 mg para os extratos e 1 mg para as substâncias puras (Tabela 4).

**Tabela 4** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli*, obtidas nos testes de difusão, variante poço e variante disco, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais

| Amostra  | Concentração (mg/poço ou disco) |     |     |     |     |     |     |     |    |   |      |     |     |   |      |   |       |     |        |     |
|--|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|---|------|-----|-----|---|------|---|-------|-----|--------|-----|
|  | 5                               |     | 4   |     | 3   |     | 2   |     | 1  |   | 0.75 |     | 0.5 |   | 0.25 |   | 0.125 |     | 0.0625 |     |
|  | P <sup>a</sup>                  | D   | P   | D   | P   | D   | P   | D   | P  | D | P    | D   | P   | D | P    | D | P     | D   | P      | D   |
| <b>Extratos</b>                                      |                                 |     |     |     |     |     |     |     |    |   |      |     |     |   |      |   |       |     |        |     |
| <i>Croton celtidifolius</i> (extrato em etanol)      | 12 <sup>b</sup>                 | 9   | 11  | 0   | 11  | 0   | 9   | 0   | 0  | 0 | _NT  | _NT | 0   | 0 | 0    | 0 | 0     | 0   | 0      | 0   |
| <i>Cyathea phalerata</i>                             | 11                              | 0   | 10  | 0   | 9   | 0   | 9   | 0   | 0  | 0 | -    | -   | 0   | 0 | 0    | 0 | 0     | 0   | 0      | 0   |
| <i>Eugenia jambolana</i> (extrato em etanol)         | 14                              | 0   | 13  | 0   | 11  | 0   | 10  | 0   | 0  | 0 | -    | -   | 0   | 0 | 0    | 0 | 0     | 0   | 0      | 0   |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato acetato de etila) | 9                               | 0   | 9   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0  | 0 | -    | -   | 0   | 0 | 0    | 0 | 0     | 0   | 0      | 0   |
| <b>Substâncias puras<sup>c</sup></b>                 |                                 |     |     |     |     |     |     |     |    |   |      |     |     |   |      |   |       |     |        |     |
| Orselinato de etila                                  | _NT                             | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | _NT | 11 | 0 | 11   | 0   | 10  | 0 | 0    | 0 | _NT   | _NT | _NT    | _NT |
| Orselinato de iso-propila                            | -                               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 15 | 0 | 11   | 0   | 10  | 0 | 9    | 0 | -     | -   | -      | -   |
| Orselinato de metila                                 | -                               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 12 | 0 | 12   | 0   | 11  | 0 | 0    | 0 | -     | -   | -      | -   |
| Orselinato de sec-butila                             | -                               | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | 11 | 0 | 11   | 0   | 11  | 0 | 11   | 0 | -     | -   | -      | -   |

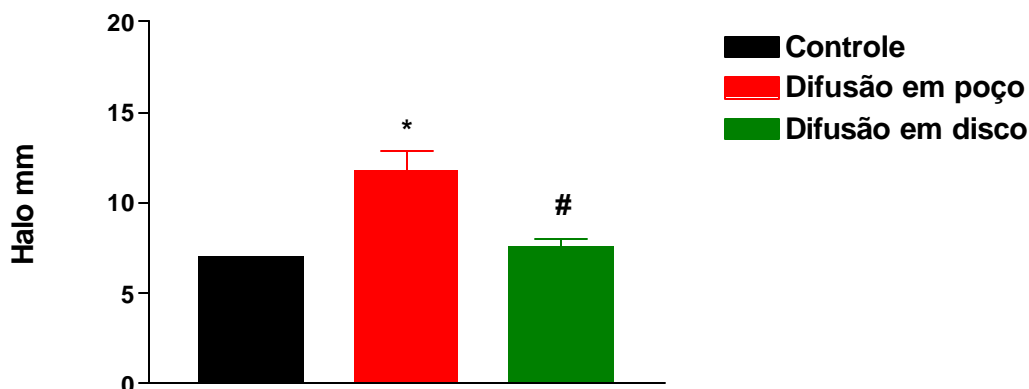
<sup>a</sup> P = Método de difusão variante poço; D = Método de difusão variante disco.

<sup>b</sup> Valor expresso em milímetros.

<sup>c</sup> Para as substâncias puras não foram realizadas repetições, sendo os resultados mostrados representativos de determinações individuais.

NT Não testado.

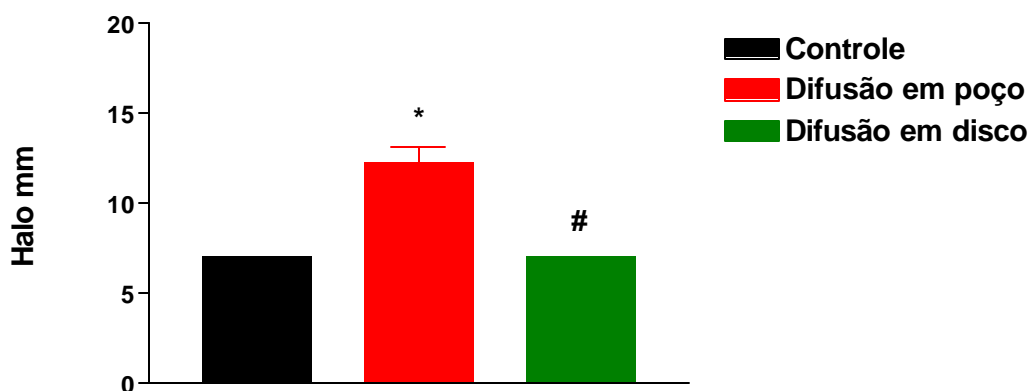
As figuras 10, 11 e 12 mostram, respectivamente, as diferenças encontradas entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão para os extratos, substâncias puras e o conjunto de ambos os produtos naturais. A *E. coli* foi resistente a todas as frações pelo teste de triagem, por esta razão não se utilizou este tipo de produto natural na comparação das variantes do método de difusão.



**Figura 10** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da *Escherichia coli* obtidas com o uso dos extratos testados (5 mg) pelas duas variantes do método de difusão GL(3,12);  $F=15,68$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

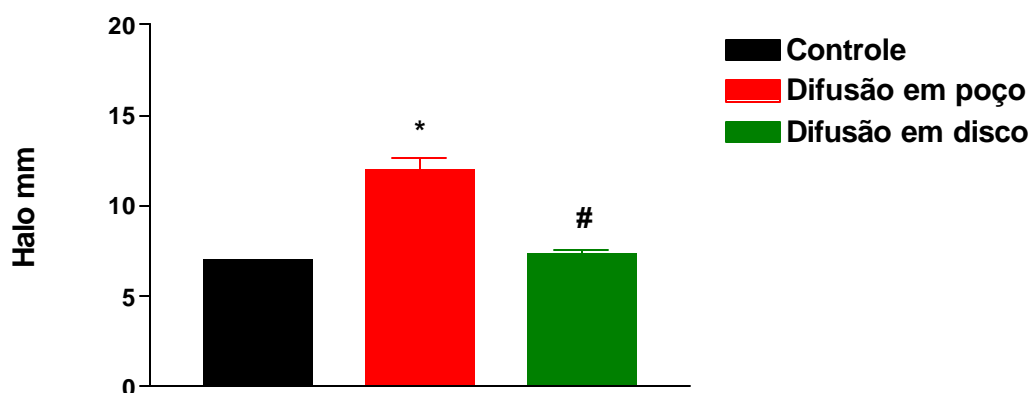
# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 11** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento da *Escherichia coli* obtidas com o uso das substâncias puras testadas (1 mg) pelas duas variantes do método de difusão GL(3,12);  $F=30,76$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 12** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento da *Escherichia coli* obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método de difusão GL(3,28);  $F=48,46$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.

Segundo Smith (2001), o processo de validação de um método inclui um componente interno e outro externo. O componente interno se refere à validade do valor numérico obtido pelo teste de sensibilidade usado e os parâmetros mais importantes que devem ser observados são a robustez e a precisão intra e interlaboratório. O componente externo se refere ao significado que pode ser atribuído ao valor numérico. O significado dos testes de sensibilidade é determinado pelo uso de valores de “breakpoint” os quais permitem a atribuição dos termos sensível ou resistente para a bactéria examinada. A validade externa, em um contexto clínico, portanto, depende criticamente da validade de um valor de “breakpoint” adotado.

A robustez pode ser definida como uma medida do grau para o qual mudanças em algum parâmetro de um protocolo de ensaio resultarão em mudanças no valor numérico da sensibilidade produzida. Sendo assim, uma grande mudança no parâmetro com alteração pequena nos valores numéricos representa uma alta robustez, enquanto que pequenas mudanças que levam a grandes alterações nos valores numéricos representa um ensaio com baixa robustez. A importância dos estudos sobre a robustez de um ensaio é determinar o rigor com o qual seus parâmetros devem ser especificados em um método padrão. Portanto, no desenvolvimento de algum método padrão, a determinação

ou estimação da robustez de todos os seus parâmetros é o passo inicial essencial (Smith, 2001).

Uma revisão feita por Rios e colaboradores em 1988 já demonstrava que fatores como método de extração, volume do inóculo, composição do meio de cultura, pH e temperatura de incubação podem influenciar nos resultados dos testes. Nos nossos experimentos, a maioria dos procedimentos foi idêntica em ambas as variantes empregadas, como o volume e concentração do inóculo, a composição do meio de cultura, o pH do meio, a quantidade do meio de cultura para cada placa de Petri com as mesmas dimensões, a concentração dos produtos naturais e a temperatura e tempo de incubação. A diferença fundamental foi na técnica pelo qual o produto natural foi exposto à bactéria indicadora. Assim, não seria justificável reavaliar a robustez do método de difusão padronizado pelo NCCLS (NCCLS, 1991; NCCLS, 1993; NCCLS, 1994; NCCLS, 1999). Desta forma, foi comparada apenas a influência desta variável na sensibilidade das variantes do método de difusão.

Como comentado anteriormente e mostrado nas figuras de 6 a 12, a variante poço demonstrou ser mais sensível que a variante disco contra as duas espécies bacterianas testadas. A confirmação da maior sensibilidade da variante poço em relação a variante disco foi verificada através da realização dos testes usando diluições dos produtos naturais. Os resultados apresentados na tabela 3 mostram que 62,0% dos 29 produtos naturais, testados pela variante poço do método de difusão, produziram halos de inibição do crescimento do *S. aureus* em diluições inferiores nas quais a variante disco não detectou atividade antibacteriana. Em 34,5% dos casos, as diluições dos produtos naturais onde foi detectado efeito antibacteriano foram iguais nas duas variantes e apenas para uma substância pura a variante disco foi mais sensível (3,5%). Do mesmo modo, os resultados mostrados na tabela 4 evidenciam que o único extrato que apresentou efeito contra a *E. coli* na variante disco também não demonstrou atividade antibacteriana nas concentrações menores (4, 3 e 2 mg), enquanto que na variante poço esse efeito foi detectado nas concentrações mencionadas. Esses resultados confirmam que com o uso da variante poço é possível detectar atividade antibacteriana em concentrações menores dos produtos naturais que com o uso da variante disco, sendo, portanto, a primeira variante a mais sensível.

Para eliminar a possibilidade de que os solventes usados nas duas variantes do método de difusão tenham ocasionado a diferença de sensibilidade observada, foi realizado um experimento empregando o método de difusão variante disco, mas dissolvendo os extratos com o DMSO, solvente usado no método de difusão variante poço (Tabela 5). Os resultados deste experimento comparados aos halos de inibição previamente encontrados pelas duas variantes do método de difusão (disco usando solventes diferentes do DMSO e poço com DMSO) mostraram não ser o DMSO o responsável pela diferença de sensibilidade encontrada entre as duas variantes do método de difusão, GL(2,24); F=12,6; p>0.01).

**Tabela 5** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*, obtidas com o uso de discos impregnados com 5 mg de extratos dissolvidos em DMSO, comparadas àquelas obtidas pelas duas variantes do método de difusão descritas neste estudo

| Amostras (5 mg)  | Halos de inibição do crescimento bacteriano |                  |       |       |       |       |
|--|---|------------------|-------|-------|-------|-------|
|  | P <sup>a</sup>                              |                  | DSDD  |       | DD    |       |
|  | Média                                       | EPM <sup>b</sup> | Média | EPM   | Média | EPM   |
| <i>Baccharis ligustrina</i><br>(extrato etanólico)       | 22,0 <sup>c</sup>                           | ± 1,0            | 12,0  | ± 0,0 | 12,5  | ± 0,5 |
| <i>Baccharis platypoda</i><br>(extrato etanólico)        | 22,5  | ± 2,5            | 11,5  | ± 0,5 | 15,5  | ± 0,5 |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i><br>(extrato etanólico) | 16,0  | ± 1,0            | 12,0  | ± 0,0 | 12,5  | ± 0,5 |
| <i>Croton celtidifolius</i><br>(extrato etanólico)       | 23,0  | ± 2,0            | 16,5  | ± 0,5 | 17,5  | ± 1,5 |
| <i>Cyathea phalerata</i><br>(extrato etanólico)          | 17,0  | ± 0,0            | 11,5  | ± 0,5 | 13,0  | ± 0,0 |
| <i>Eugenia jambolana</i><br>(extrato etanólico)          | 20,0  | ± 0,0            | 15,0  | ± 0,0 | 16,5  | ± 0,5 |
| <i>Eugenia uniflora</i><br>(extrato etanólico)           | 21,0  | ± 0,0            | 18,5  | ± 0,5 | 18,5  | ± 0,5 |
| <i>Lippia alba</i><br>(fração acetato de etila)          | 19,0  | ± 1,0            | 14,5  | ± 0,5 | 16,0  | ± 0,0 |
| <i>Lippia alba</i><br>(fração butanólica)                | 15,5  | ± 0,5            | 13,5  | ± 0,5 | 14,0  | ± 0,0 |

<sup>a</sup> P = Método de difusão variante poço; DSDD = Método de difusão variante disco com solvente diferente de DMSO; DD = Método de difusão variante disco com DMSO como solvente.

<sup>b</sup> EPM = Erro padrão da média.

<sup>c</sup> Valor expresso em milímetros.



O “Welac Working Group” (1993) tem dado pouca importância para a sensibilidade dos métodos para o teste de sensibilidade aos antibióticos (TSA) em relação à validade interna de um método analítico. Para antibióticos conhecidos, com atividade antibacteriana comprovada, a sensibilidade dos métodos realmente não é um fator decisivo para a interpretação dos resultados obtidos no TSA. No entanto, para os testes com produtos naturais, mais especificamente para os extratos e frações, a sensibilidade dos métodos empregados desempenha um papel importante. Sabe-se que os extratos e as frações são misturas complexas de vários compostos, sendo a concentração de cada um dos compostos presentes nessa mistura variável. O composto que apresenta atividade antibacteriana pode ser aquele presente em altas concentrações no extrato ou fração, porém, ele pode ser aquele presente em concentração muito pequena. Assim, quando pesamos 5 mg do extrato ou fração para o teste de difusão em ágar, podemos ter uma concentração satisfatória ou não da substância ativa a ser testada. Pelo fato dos métodos de difusão em gel serem empregados para testes de triagem de produtos naturais com atividade antibacteriana, consideramos importante o uso da técnica com maior sensibilidade para não correr o risco de se perder compostos com efeitos antibacterianos potenciais.

Conforme definido por Smith (2001), precisão é a medida do grau de concordância entre determinações separadas da sensibilidade de uma bactéria particular. Ela pode e deve ser avaliada de dados gerais em ensaios separados realizados pelo mesmo operador no mesmo laboratório, por operadores diferentes no mesmo laboratório, e por operadores separados em laboratórios separados. Um alto grau de precisão será possível somente se os protocolos para a realização de todas as etapas chave são rigorosamente especificados no método padrão. As etapas chave podem ser definidas como aquelas onde o ensaio manifesta sua mais baixa robustez.

A precisão interoperador e interlaboratório pode ser determinada melhor com o uso de cepas controle padrão. Uma vez que dados suficientes tenham sido acumulados na precisão de algum método particular, então protocolos muito similares podem ser usados para monitorar a performance de operadores individuais e laboratórios. Dos dados gerados nos estudos de precisão, será possível estabelecer os limites de aceitabilidade para os valores numéricos de

sensibilidade, gerados pelo ensaio, para a cepa particular de bactéria adotada como controle. Esses limites de aceitabilidade podem então ser empregados para monitorar a performance do ensaio (Smith, 2001). O documento NCCLS, NCCLS M37-A (NCCLS, 1999) delineia protocolos apropriados para estabelecer tais limites de confiança. Um outro documento do NCCLS (1993) recomenda algumas cepas para serem usadas nos estudos de difusão em disco com bactérias isoladas de humanos. Os limites de confiança são totalmente dependentes do método e serão particularmente afetados por fatores tal como a temperatura de incubação.

Da mesma forma que a determinação da exatidão, a determinação da precisão também é dependente do método usado. Alguns métodos, devido as suas propriedades particulares, possuem limites de confiança mais estreitos, enquanto em outros estes são maiores. De qualquer modo, é possível, quando se realizam repetições do teste, estabelecer a precisão do método.

Considerando as limitações do presente estudo, podemos afirmar que os resultados encontrados sugerem que ambas as variantes apresentam uma boa precisão. Em quase todos os produtos naturais testados os valores obtidos para o halo de inibição de crescimento das duas bactérias foram similares nas duas repetições realizadas. O erro padrão da média (EPM) calculado para cada produto natural individualmente, na maior concentração empregada, atingiu o valor máximo de 2,5, mostrando que os testes geram valores que são reprodutíveis. Além disso, considerando que o número de produtos naturais que foram testados foi relativamente elevado (29 contra *S. aureus* e 8 contra *E.coli*) e que foram executadas várias diluições para cada produto natural, como mostrado nas tabelas 4 e 5, sendo cada uma delas testada em duplicata (para os extratos e frações), isso nos permite avaliar a precisão dos métodos com uma margem de segurança satisfatória. Obviamente que nosso experimento ficou limitado ao nosso laboratório e, para aumentar o grau de confiança nos resultados obtidos, seria recomendado que os testes fossem repetidos em outros laboratórios.

Além de diferenciar a sensibilidade das duas variantes do método de difusão, a análise dos resultados obtidos no presente estudo ainda permitiu sugerir as quantidades de produtos naturais a serem usadas nos testes. Para esta

análise serão usados apenas os dados das tabelas 3 e 4 referentes ao método de difusão variante poço, uma vez que a mesma mostrou ser a mais sensível. Dos 14 extratos ativos contra o *S. aureus* na concentração de 5 mg (100%), 12 (85,7%) apresentaram inibição do crescimento dessa bactéria na concentração de 4 mg. Com relação à *E. coli*, os 4 extratos ativos com o uso de 5 mg foram também ativos com o uso de 4 mg. Em relação às frações, as sete que demonstraram ser ativas contra o *S. aureus* na concentração de 5 mg (100%), continuaram apresentando atividade até a concentração de 3 mg. As oito substâncias puras testadas contra o *S. aureus* e as 4 testadas contra a *E. coli* que foram ativas na concentração de 1mg, mantiveram seu efeito antibacteriano até a concentração de 0,5 mg.

Os processos de obtenção de extratos, frações e substâncias puras são, de modo geral, trabalhosos e demorados. As novas tecnologias que aceleram o processo ainda não são acessíveis a todos os pesquisadores. Além disso, os produtos naturais usados nos processos de extração são muitas vezes difíceis de serem obtidos na natureza. Por essas razões é de fundamental importância o uso adequado desses produtos de origem natural nos testes de atividades biológicas para não haver desperdícios dos recursos naturais.

Na literatura é muito variável a quantidade usada de extratos, frações e substâncias puras nos testes de atividade antibacteriana. Alguns exemplos encontrados são: 25 mg de extratos (Cáceres *et al.*, 1991), 15 mg (Ahmad e Beg, 2001), 10 mg (Okeke *et al.*, 2001) e 4 mg (Ali *et al.*, 2001). Para as frações e substâncias puras também existem discrepâncias nas concentrações usadas nos testes (Lemos *et al.*, 1990; Bisignano *et al.*, 2001; Ojala *et al.*, 2000). É preciso que os pesquisadores unifiquem os procedimentos usando concentrações similares dos produtos naturais para facilitar, ou até mesmo tornar viável, a interpretação e comparação dos resultados obtidos por eles.

Tendo em vista os resultados obtidos, as dificuldades encontradas para a obtenção dos extratos, a importância do uso ético dos produtos naturais e a grande variação da quantidade de produtos naturais atualmente usada nos testes antibacterianos, recomendamos que na escolha entre as duas variantes descritas, seja feita a opção pelo teste de difusão em ágar com o uso de poços e sugere-se

que os volumes de extratos, frações e substâncias puras sejam de 4 mg, 3 mg e 0,5 mg, respectivamente.

Além da maior sensibilidade do método de difusão variante poço já demonstrada neste trabalho, outros argumentos são favoráveis ao uso dessa variante para a triagem de produtos naturais para a atividade antibacteriana. Segundo Vanden Berghe e Vlietinck (1991), o método de difusão em placas com poços realizados no gel são apropriados para testar extratos de produtos naturais que não podem ser esterilizados, pois se existir alguma bactéria contaminante, esta ficará confinada aos reservatórios e não será, portanto, capaz de espalhar e contaminar o sistema teste. Isso é importante porque os procedimentos de esterilização podem resultar na perda da atividade antibacteriana. A filtração pode eliminar dispersões aquosas ou emulsões e a autoclavação, apesar de barata, pode propiciar a perda do efeito antibacteriano de compostos termoinstáveis. Dessa forma, preparando-se as amostras de um modo asséptico (tubos, frascos e ponteiros esterilizados e o uso de capela de fluxo laminar) já é o suficiente para a realização dos testes. Ainda conforme Vanden Berghe e Vlietinck (1991), o método com poços feitos nas placas é apropriado para testar suspensões aquosas de produtos naturais. Nesse método, a presença de matéria particulada suspensa interfere menos na difusão da substância com efeito antibacteriano para o meio que no método com discos de papel filtro. A precipitação de substâncias insolúveis em água no disco possivelmente dificultará a difusão para o ágar.

Outros fatores importantes que incentivam o uso da variante com poço e desestimulam o uso da variante com disco são os tempos consumidos para o desenvolvimento de ambos e a simplicidade da primeira variante. Na variante com disco, dependendo do número de amostras para testar, são gastas algumas horas a mais para aplicar os produtos nos discos, além do tempo necessário para que os discos fiquem secos. Dependendo do solvente usado para dissolver os produtos naturais pode-se esperar até 12 horas. Além disso, essa variante é muito trabalhosa. A impregnação de cada disco é um processo muito entediante. Em termos de custos, as duas variantes do método de difusão praticamente se equivalem, sendo a variante com discos um pouco mais cara devido ao preço do papel Whatman usado.

Brantner e colaboradores (1994) mencionaram um outro fator que suporta o uso do método de difusão variante poço. Segundo eles, esse método admite um volume grande a ser aplicado e isso permite que preparações com baixas concentrações dos compostos-teste sejam usadas, porém deve-se tomar cuidado com o solvente usado, uma vez que os organismos podem ser sensíveis ao solvente (toxicidade do solvente). Ainda nesse sentido, o método de difusão variante disco não é apropriado para o teste de compostos pouco solúveis ou ativos, pois grandes volumes têm que ser usados e este método se torna relativamente lento e trabalhoso, sendo um método recomendado apenas para a aplicação de altas concentrações em pequenos volumes.

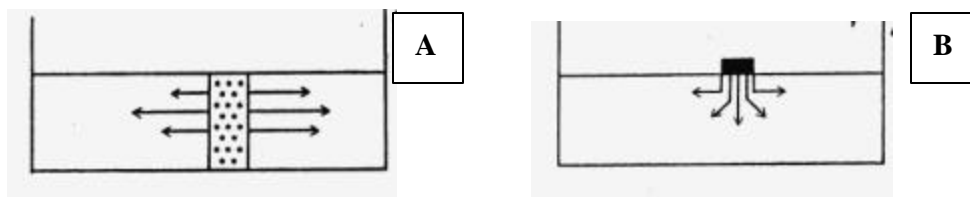
O papel filtro que geralmente é usado para o preparo dos discos é o Whatman, o qual é composto de celulose (i.e. monômeros de glicose com ligações  $\beta$  (1-4)). Os muitos grupos de hidroxilas livres presentes em cada um dos resíduos de glicose tornam a superfície do disco hidrofílica, como descrito por Braithwaite e Smith, 1990. Assim, se os produtos naturais em análise forem catiônicos, os mesmos podem ser adsorvidos na superfície do disco, e difundiriam menos para o meio. Conseqüentemente, um composto polar catiônico pode possuir boa atividade antibacteriana, mas a mesma poderá ser prejudicada pelo método de difusão variante disco. Os compostos apolares não sofreriam essa atração pelas hidroxilas da superfície do papel e difundiriam normalmente. Sendo assim, o uso da metodologia com poços feitos no gel elimina esse problema. Esse argumento pode também explicar, pelo menos em parte, a maior sensibilidade encontrada com o uso do método de difusão com poços feitos no ágar.

O maior halo de inibição obtido na variante poço pode também estar relacionado com o transporte do produto natural pelo DMSO, pois é esperado que tanto o DMSO, quanto os produtos naturais difundam para o ágar. Na variante disco, a difusão provavelmente ocorre por capilaridade pela água contida no meio e derivada da solvatação, uma vez que o solvente usado na dissolução dos produtos naturais é evaporado antes da aplicação dos discos na placa.

O processo de difusão pode ser definido como o movimento aleatório de partículas de regiões de alta concentração para regiões de concentrações inferiores. A difusão depende de vários fatores, entre os quais o número, o

tamanho e a forma das partículas. O número de partículas é convenientemente considerado na concentração: quanto maior o gradiente de concentração, mais rápida é a difusão. O volume da partícula tem grande importância. Partículas menores se difundem mais rapidamente. Quando o raio molecular aumenta, a difusão diminui com o quadrado do raio por causa do aumento nas interações friccionais entre soluto e solvente. Sendo assim, pequenos aumentos nos raios levam a uma diminuição drástica na difusão. A forma tem certa importância, e cilindros se difundem mais rapidamente do que esferas. O processo da difusão é bem definido formalmente pelas duas leis de Fick (Heneine, 2000).

Observando-se os padrões de difusão mostrados na figura 13, percebe-se que no método com poço o produto natural difunde radialmente fazendo uma trajetória horizontal, podendo alcançar distâncias maiores no mesmo intervalo de tempo adotado para o método com disco. Neste método, em contrapartida, a direção da difusão é oblíqua ao plano horizontal, pois ela é a resultante da difusão que ocorre para baixo e para o lado (horizontal). Nesse último caso, os compostos de origem natural tendem a atingir uma distância menor do ponto de partida.



**Figura 13** – Diferentes padrões de difusão nas variantes poço (A) e disco (B) do método de difusão em ágar (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991)

Naturalmente, com o aumento da temperatura, a difusão é maior, porque as moléculas possuem maior energia cinética. Outro fator que influi na difusão é o tempo. A distância atingida pelas moléculas difundidas é aproximadamente proporcional ao inverso do quadrado do tempo. Assim, se a molécula em 1 milissegundo (ms) atinge 2 nanômetros (nm), levará 4 ms para chegar a 2 nm e 9 ms para 3 nm (Heneine, 2000).

Nota-se também na literatura que alguns pesquisadores (Linton, 1983; Onawunmi et al., 1984; Janssen et al., 1986), na intenção de aumentar o diâmetro de inibição, colocam o sistema inoculado na geladeira ( $\pm 4^{\circ}\text{C}$ ) durante várias horas, antes da incubação a  $36^{\circ}\text{C}$ , com o intuito de favorecer a difusão sobre o crescimento bacteriano. Segundo esses pesquisadores, temperaturas baixas facilitariam a difusão e dificultariam o crescimento bacteriano. No presente estudo, esta alternativa foi descartada uma vez que é conhecido que a difusão é diretamente proporcional à temperatura, como relatado no parágrafo anterior. Além disso, a diminuição da temperatura favorece, como descrito por Vanden Berghe e Vlietinck (1991), a precipitação das substâncias antibacterianas, podendo diminuir a difusão destas para o ágar.

Além da polaridade das amostras, o pH dos solventes também deveria ser checado antes do teste, uma vez que o crescimento dos microrganismos pode ser inibido no meio o qual tem sido tornado ácido ou alcalino demais. As atividades antibacterianas de componentes ativos são modificadas com pequenas alterações no pH. Nos trabalhos práticos, o pH dos extratos e frações deveria ser ajustado para a neutralidade (pH entre 6,0 e 8,0) ou dissolvem-se os mesmos em solução tamponada (Vanden Berghe e Vlietinck, 1991). No nosso trabalho, como o objetivo foi comparar variantes do método de difusão e não atividade de produtos naturais entre si, a variável pH não foi considerada.

Mesmo considerando todas as vantagens do método de difusão variante poço apresentadas neste trabalho, deve-se tomar cuidado com as limitações desse método. Vanden Berghe e Vlietinck (1991) relataram que os métodos de difusão não são a melhor escolha para testar amostras apolares ou outras amostras de difícil difusão no meio de cultura. Segundo estes pesquisadores, dispersões aquosas contendo substâncias com alto peso molecular ( $>100.000$  Daltons) também devem ser evitadas nos métodos de difusão, pois elas não podem difundir no meio com 1% de ágar. Para esses casos, pode-se sugerir métodos alternativos como bioautografia direta ou métodos de diluição semi-quantitativos.

### 5.3. MÉTODO BIOAUTOGRÁFICO

O método bioautográfico foi acrescentado aos tradicionais protocolos usados na pesquisa de produtos naturais com atividade antibacteriana em 1946, por Goodall e Levi. Atualmente este método é bem difundido e usado principalmente por integrantes de laboratórios de química de produtos naturais, devido às facilidades encontradas no desenvolvimento do mesmo. Tendo em vista as diferentes metodologias descritas para a execução do método, serão discutidas a seguir as variáveis inóculo e solução reveladora, em duas variantes do método: bioautografia direta e indireta.

#### 5.3.1. ESTABELECIMENTO DE PROCEDIMENTOS ADEQUADOS PARA A REALIZAÇÃO DOS TESTES PELA VARIANTE DIRETA DO MÉTODO DE BIOAUTOGRAFIA

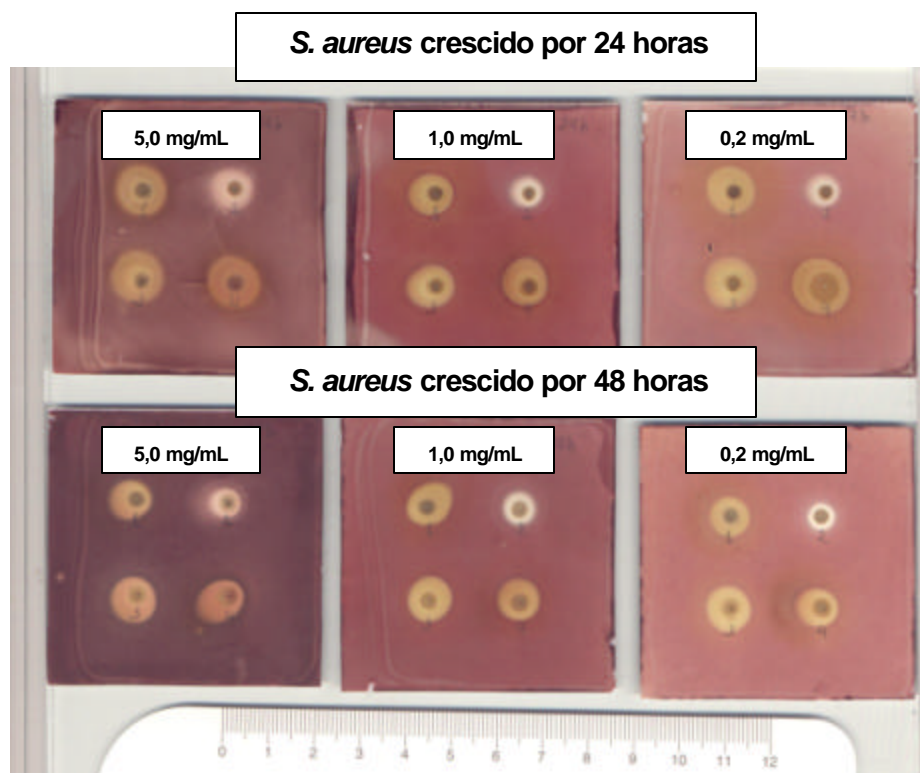
Conforme já foi discutido anteriormente, junto com os resultados relacionados com as variantes do método de difusão em ágar, a robustez se refere a uma medida do grau para o qual mudanças em algum parâmetro de um protocolo de ensaio resultarão em mudanças no valor numérico produzido. Um ensaio robusto gera um alto grau de precisão dos resultados. Sendo assim, é importante conhecermos as conseqüências das alterações dos parâmetros do teste para garantir a maior precisão possível nos resultados obtidos. Dentro deste enfoque, a tabela 6 apresenta os resultados referentes à padronização de duas variáveis usadas na variante direta do método bioautográfico: tempo de incubação do organismo-teste para o preparo do inóculo e concentração da solução de *p*-iodonitrotetrazolium violeta usada como revelador do crescimento bacteriano. Como pode ser observado, não houve diferença significativa entre os resultados obtidos com o inóculo preparado com cultura de *S. aureus* incubada por 24 h com relação às culturas de 48 h (GL14;  $t=0,46$ ;  $p>0,01$ ). Com relação à outra variável estudada, também foi evidenciado que as três concentrações usadas do revelador (0,2; 1,0 e 5,0 mg/mL) foram suficientes para permitir a leitura dos resultados (Figura 14).



**Tabela 6** - Resultados dos testes realizados pela variante direta do método bioautográfico com o uso do *Staphylococcus aureus* crescidos por 24 e 48 horas e revelados com três concentrações do sal de tetrazólio

| Amostras<br>(400 mg)                                   | Halos de inibição do crescimento |              |              |                     |              |              |
|--|----------------------------------|--------------|--------------|---------------------|--------------|--------------|
|  | Crescimento de 24 h              |              |              | Crescimento de 48 h |              |              |
|  | 0.2<br>mg/mL                     | 1.0<br>mg/mL | 5.0<br>mg/mL | 0.2<br>mg/mL        | 1.0<br>mg/mL | 5.0<br>mg/mL |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis ligustrina</i>       | 10 <sup>a</sup>                  | 9            | 10           | 8                   | 10           | 9            |
| Extrato em clorofórmio de <i>Baccharis platypoda</i>   | 6                                | 6            | 8            | 6                   | 6            | 6            |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis platypoda</i>        | 11                               | 10           | 11           | 10                  | 10           | 9            |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> | 12                               | 10           | 11           | 8                   | 9            | 10           |
| Extrato etanólico de <i>Croton celtidifolius</i>       | 9                                | 10           | 10           | 10                  | 10           | 10           |
| Extrato etanólico de <i>Cyathea phalerata</i>          | 7                                | 7            | 8            | 7                   | 7            | 8            |
| Extrato etanólico de <i>Eugenia jambolana</i>          | 6                                | 6            | 6            | 4                   | 5            | 4            |
| Extrato etanólico de <i>Polygala paniculata</i>        | 0                                | 0            | 0            | 0                   | 0            | 0            |

<sup>a</sup> Valores expressos em milímetros.



**Figura 14** – Resultados da revelação dos sistemas-teste usando três concentrações do sal de *p*-iodonitrotetrazolium violete e *Staphylococcus aureus* crescidos por 24 e 48 horas

O estudo referente ao preparo do inóculo foi incorporado no presente trabalho, uma vez que, em alguns dos artigos consultados, os autores não deixam claro o procedimento usado (Afolayan e Meyer, 1997; Nostro *et al.*, 2000). A concentração do sal de tetrazólio a ser usada nos testes foi avaliada devido à variação da mesma encontrada na literatura. Enquanto Nostro e colaboradores (2000) e Eloff (2001) usaram uma solução do sal de 2 mg/mL, Hamburger e Cordell (1987) usaram uma solução com concentração de 5 mg/mL.

De acordo com os resultados obtidos, no desenvolvimento dos demais estudos relacionados com o método bioautográfico, foi adotado o preparo do inóculo bacteriano a partir de cultivo de 24 h e da solução reveladora à concentração de 0,2 mg/mL. Estes estudos foram conduzidos apenas com a espécie bacteriana *S. aureus*, entretanto, as condições descritas acima foram adotadas também para a espécie *E. coli*, pois ambas as espécies dispensam condições especiais para a multiplicação celular. A adoção desses dois procedimentos resulta na economia de tempo e recursos, uma vez que o custo do sal de tetrazólio é elevado.

Beghe e Kline (1972) mostraram que “*p*-iodonitrotetrazolium violet” (INT), “tetranitro blue tetrazolium” (TNBT) e “methyl thiazolyl tetrazolium” (MTT) demonstraram ser bons substratos para a reação enzimática. Porém, Hamburger e Cordell (1987) compararam esses três sais e preferiram usar o INT, uma vez que esse sal de tetrazólio, em contraste com os outros dois mencionados, é incolor, facilitando a avaliação do bioautograma. Por essa razão e pela simplicidade em preparar uma solução de INT em etanol a 70%, resolvemos adotar este revelador para a realização deste trabalho. Convém ainda enfatizar que a ação anti-séptica do etanol diminui o risco de contaminação pelo manuseio dos sistemas-teste, sendo essa característica importante para esse ensaio biológico.

Hamburger e Cordell (1987) constataram também que a quantidade de “formazan” produzida pela reação enzimática aumenta no decorrer de algumas horas e recomendam a incubação dos sistemas borrifados com INT por 4 horas. Todavia, Yff e colaboradores (2002) borrifaram uma solução de 2 mg/mL de INT e incubaram as placas de CCD em ambiente com 100% de umidade por apenas 30

minutos antes da leitura dos resultados. Nos primeiros testes que realizamos, mantivemos os sistemas incubados por 6 horas. Na primeira hora já foi possível distinguir, sem dificuldades, as áreas de inibição com relação à área com crescimento bacteriano. Entretanto, aceitamos a sugestão de Hamburger e Cordell (1987) e mantivemos os sistemas incubados por 4 h, uma vez que observamos que durante este período houve aumento da intensidade de cor e, após as 4 horas, a área de crescimento aparentemente não sofreu variação na coloração. Além disso, usamos uma concentração 10 vezes menor que aquela usada por Yff e colaboradores (2002).

Outra etapa do método que difere entre os artigos consultados, se refere à forma de colocar a suspensão bacteriana em contato com a placa de CCD contendo produtos naturais aplicados. Martini e Eloff (1998) borrifam a suspensão bacteriana sobre a placa de CCD, enquanto Falch e colaboradores (1995) mergulham a placa de CCD no inóculo bacteriano. No nosso trabalho adotamos o procedimento de imergir a placa de CCD na suspensão bacteriana, uma vez que mantém os microrganismos em sistemas fechados e não dispersos no ar.

A opção pelo uso da placa de CCD de gel de sílica G60 F<sub>254</sub> foi apoiada nos resultados obtidos por Hamburger e Cordell (1987). Segundo esses pesquisadores, poliamida 11 e óxido de alumínio, como fases estacionárias, demonstraram resultados pobres.

### **5.3.2. AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE APLICAÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO NA PRÁTICA DA BIOAUTOGRAFIA INDIRETA**

Na variante indireta do método de bioautografia, o produto natural aplicado na placa de CCD deve difundir para o ágar, passo esse inexistente no ensaio bioautográfico direto. Sendo assim, o inóculo bacteriano deve ser aplicado na camada de ágar presente sobre a placa de CCD, ao invés de ser aplicado diretamente nesta, como ocorre na variante direta. Na literatura referente ao ensaio bioautográfico indireto, são descritos dois modos para estabelecer esse contato: o primeiro se refere à aplicação da suspensão bacteriana na superfície do gel com auxílio de “swab” (Afolayan e Meyer, 1997) e o segundo se refere à

inoculação da bactéria ao ágar antes que este seja vertido sobre a placa de CCD (“Pour plate”) (Caccamese *et al.*, 1989). Nesse sentido, comparamos essas duas formas de estabelecer o contato da bactéria com o produto natural. Para realizar esses testes foram usados nove extratos na concentração de 400 µg e a bactéria *S. aureus*. Os testes foram realizados em duplicata. Os resultados obtidos estão mostrados na tabela 7 e indicaram não existir diferença significativa entre as técnicas usadas para aplicar o inóculo bacteriano (GL16;  $t = 1,17$ ;  $p > 0,01$ ).

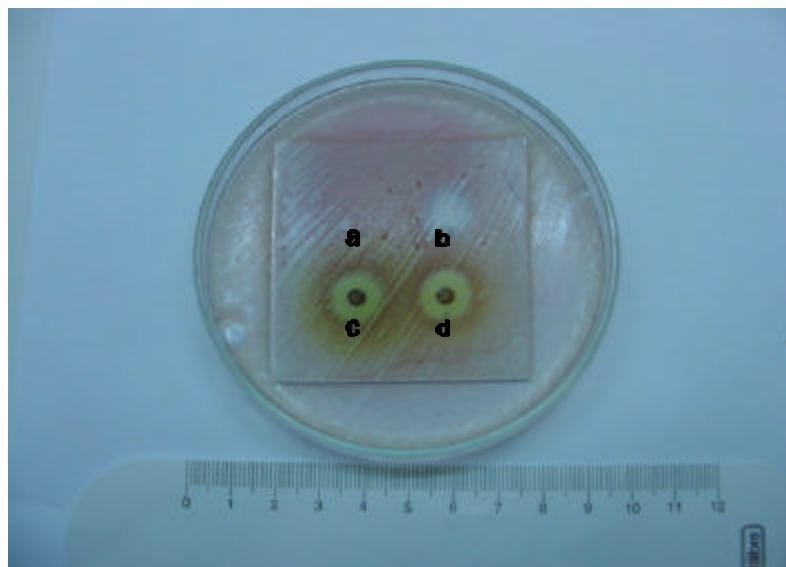
**Tabela 7** – Médias e erros padrões da média dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus*, obtidas pelo método de bioautografia, variante indireta, realizado com a suspensão bacteriana inoculada com o auxílio de “swab” e misturada com o ágar (“Pour Plate”)

| Amostras (400 mg)                                      | Halos de inibição do crescimento em mm |                  |              |       |
|--|--|------------------|--------------|-------|
|  | “Swab”                                 |                  | “Pour plate” |       |
|  | Média                                  | EPM <sup>a</sup> | Média        | EPM   |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis ligustrina</i>       | 10,0 <sup>b</sup>                      | ± 0,0            | 9,0          | ± 0,0 |
| Extrato em clorofórmio de <i>Baccharis platypoda</i>   | 7,5                                    | ± 0,5            | 6,0          | ± 0,0 |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis platypoda</i>        | 11,5                                   | ± 0,5            | 10,5         | ± 0,5 |
| Extrato etanólico de <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> | 10,5                                   | ± 0,5            | 9,0          | ± 0,0 |
| Extrato etanólico de <i>Croton celtidifolius</i>       | 11,5                                   | ± 1,5            | 11,0         | ± 0,0 |
| Extrato etanólico de <i>Cyathea phalerata</i>          | 8,0                                    | ± 0,0            | 9,0          | ± 0,0 |
| Extrato etanólico de <i>Eugenia jambolana</i>          | 10,5                                   | ± 0,5            | 8,5          | ± 1,5 |
| Extrato etanólico de <i>Eugenia uniflora</i>           | 12,5                                   | ± 0,5            | 11,0         | ± 0,0 |
| Extrato em clorofórmio de <i>Ganoderma anularis</i>    | 7,5                                    | ± 0,5            | 6,5          | ± 0,5 |
| Total  | 9,9                                    | ± 0,6            | 8,9          | ± 0,6 |

<sup>a</sup> EPM = Erro Padrão da Média.

<sup>b</sup> Valores expressos em milímetros.

Os resultados encontrados sugerem que ambas as formas empregadas para estabelecer o contato da suspensão bacteriana com o produto natural na variante indireta do método bioautográfico podem ser usadas. Independente do tipo de inóculo, a aparência dos sistemas é semelhante. Na figura 15 está ilustrado um modelo de sistema-teste usado na técnica de bioautografia indireta onde o inóculo foi realizado com auxílio de “swab”.



**Figura 15** - Modelo de sistema-teste usado na variante indireta do método de bioautografia com o inóculo semeado com auxílio de “swab”. a, controle negativo (solvente no qual foi dissolvido o produto natural); b, controle positivo (20  $\mu$ g do antibiótico cloranfenicol); c e d, produtos naturais testados

### 5.3.3. COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS COM O USO DAS VARIANTES DO MÉTODO BIOAUTOGRÁFICO

Dos 29 produtos naturais que foram testados pelas variantes do método de difusão em ágar, apenas 16 foram usados nos testes de comparação das variantes do método de bioautografia, pois 5 extratos, 5 frações e 3 substâncias puras foram excluídas devido suas quantidades insuficientes.

Na tabela 8 estão mostrados os diâmetros dos halos de inibição de crescimento das bactérias *S. aureus* e *E. coli* produzidos pelos extratos, frações e substâncias puras testadas pelas variantes direta e indireta do método bioautográfico. Para as frações e substâncias puras empregadas não foram realizadas repetições devido a pouca quantidade desses produtos naturais, sendo assim, não foi possível determinar as diferenças individuais para esses tipos de produtos naturais em relação às duas variantes do método bioautográfico empregadas.

**Tabela 8** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento das bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* obtidas com o uso das variantes direta e indireta do método bioautográfico

| Amostras  | Halos de inibição de crescimento |                   |                |      |
|---|----------------------------------|-------------------|----------------|------|
|   | <i>S. aureus</i>                 |                   | <i>E. coli</i> |      |
|   | B.D. <sup>b</sup>                | B.I.              | B.D.           | B.I. |
| <b>Extratos<sup>a</sup></b>                                 |                                  |                   |                |      |
| <i>Baccharis ligustrina</i> (extrato etanólico)             | 10,0 <sup>c</sup>                | 9,0               | 14,5           | 8,0  |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato em clorofórmio)         | 6,5                              | 6,0               | 0              | 0    |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato etanólico)              | 10,0                             | 10,5              | 11,5           | 0    |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> (extrato etanólico)       | 9,0                              | 9,0               | 13,0           | 0    |
| <i>Croton celtidifolius</i> (extrato etanólico)             | 10,5                             | 11,0              | 0              | 0    |
| <i>Cyathea phalerata</i> (extrato etanólico)                | 7,5                              | 9,0               | 0              | 0    |
| <i>Eugenia jambolana</i> (extrato etanólico)                | 6,5                              | 8,5               | 5,5            | 7,0  |
| <i>Eugenia uniflora</i> (extrato etanólico)                 | 7,5                              | 11,0              | 6,0            | 7,0  |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato em clorofórmio)          | 7,5                              | 6,5               | 5,5            | 0    |
| <b>Frações</b>  |                                  |                   |                |      |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i> (fração acetato de etila) | 9,0 <sup>d</sup>                 | 10,0              | 7,0            | _NT  |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i> (fração hexano)           | 6,0 <sup>d</sup>                 | 9,0               | 0              | _NT  |
| <b>Substâncias puras</b>                                    |                                  |                   |                |      |
| Orselinato de butila  | 17,0 <sup>d</sup>                | 12,0 <sup>d</sup> | _NT            | _NT  |
| Orselinato de iso-propila                                   | 15,0 <sup>d</sup>                | 12,0 <sup>d</sup> | _NT            | _NT  |
| Orselinato de metila  | 7,0 <sup>d</sup>                 | 10,0 <sup>d</sup> | _NT            | _NT  |
| Orselinato de pentila                                       | 22,0 <sup>d</sup>                | 11,0 <sup>d</sup> | _NT            | _NT  |
| Orselinato de sec-butila                                    | 17,0 <sup>d</sup>                | 12,0 <sup>d</sup> | _NT            | _NT  |

<sup>a</sup> Foram usadas 400 µg de extratos, 200 µg de frações e 100 µg de substâncias puras.

<sup>b</sup> B.D. = Método bioautográfico variante direta; B.I. = Método bioautográfico variante indireta pela técnica "Pour plate".

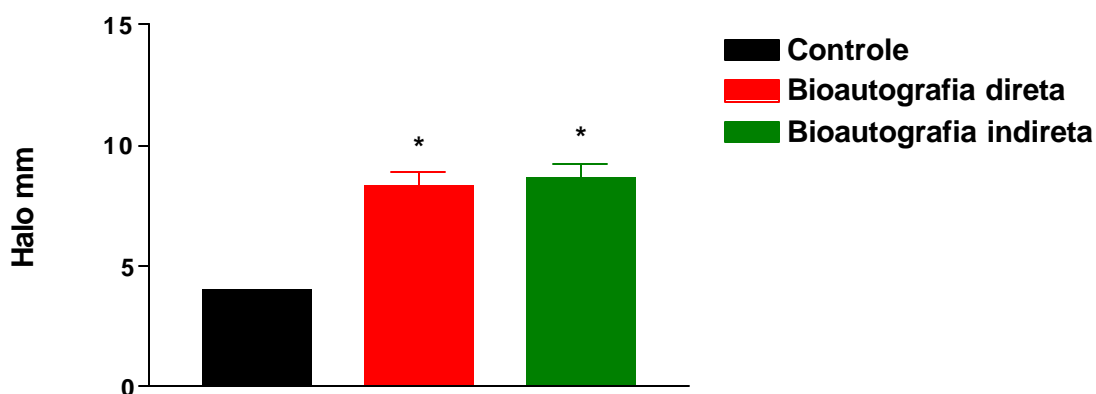
<sup>c</sup> Valores expressos em milímetros.

<sup>d</sup> corresponde a uma determinação individual e não à média (testes sem repetições).

NT testes não realizados devido à insuficiência dos produtos naturais.

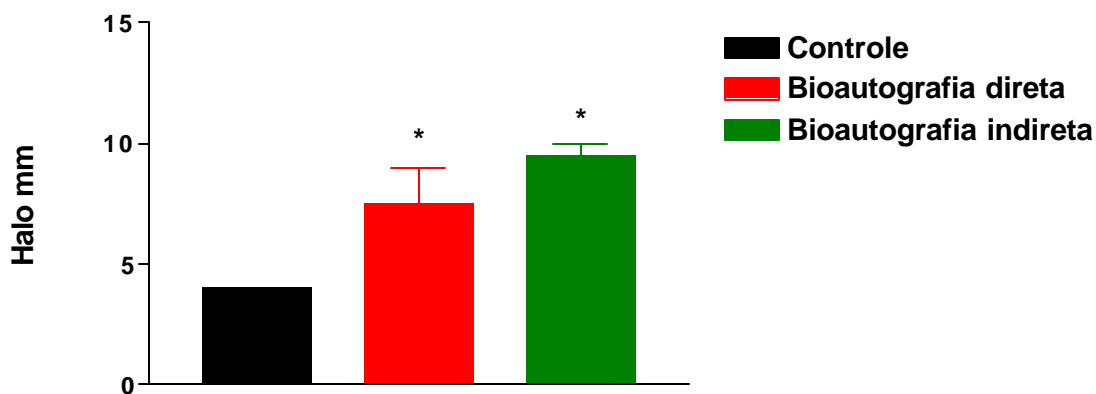
Pela avaliação dos dados obtidos nos experimentos realizados com as variantes do método de bioautografia, contra a bactéria *S. aureus*, foi constatado não existir diferença significativa na detecção da atividade antibacteriana entre as variantes para a mesma concentração do produto natural usada. Dos nove extratos usados nos testes, oito (88,9%) mostraram resultados similares entre as duas variantes GL(18,19); F=12,91; p>0.01. Na tabela 8 só foi usada a maior concentração (400 µg). Para o único extrato que apresentou diferença significativa nos diâmetros obtidos, o maior halo foi encontrado na variante indireta do método bioautográfico.

As comparações das médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento do *S. aureus* obtidas para os extratos, frações, substâncias puras e para o conjunto de todos os produtos naturais usados são mostradas nas figuras 16, 17, 18 e 19, respectivamente. Observando-se as figuras citadas, pode ser visto que somente nos testes envolvendo as substâncias puras (Figura 18), é que ocorreram diferenças significativas entre as médias encontradas nas duas variantes do método bioautográfico, GL(3,16);  $F=21,58$ ;  $p<0,01$ . Com o uso de extratos e frações, bem como na comparação geral de todos os produtos naturais testados, não foi verificada essa diferença. É importante salientar que estamos levando em consideração apenas a maior concentração usada dos extratos (400  $\mu\text{g}$ ).



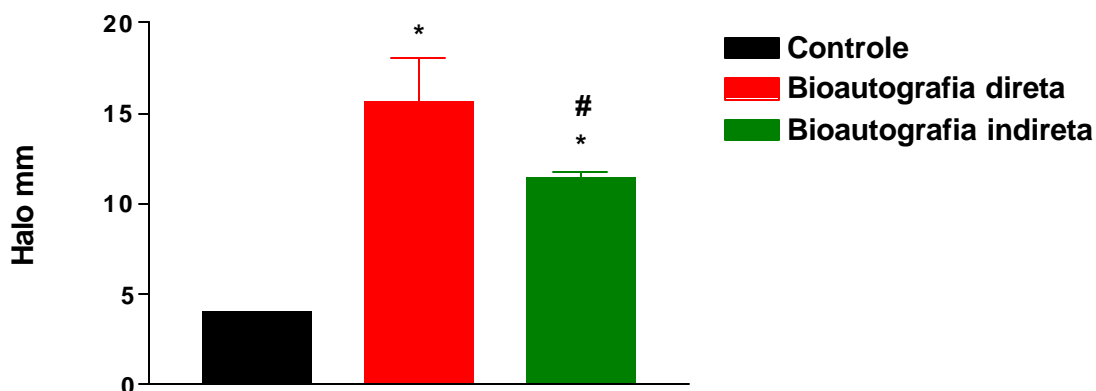
**Figura 16** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso dos extratos testados (400  $\mu\text{g}$ ) pelas duas variantes do método bioautográfico GL(3,32);  $F=46,08$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle.



**Figura 17** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso das frações testadas (200  $\mu\text{g}$ ) pelas duas variantes do método bioautográfico GL(3,4);  $F=11,87$ ;  $p<0.05$ .

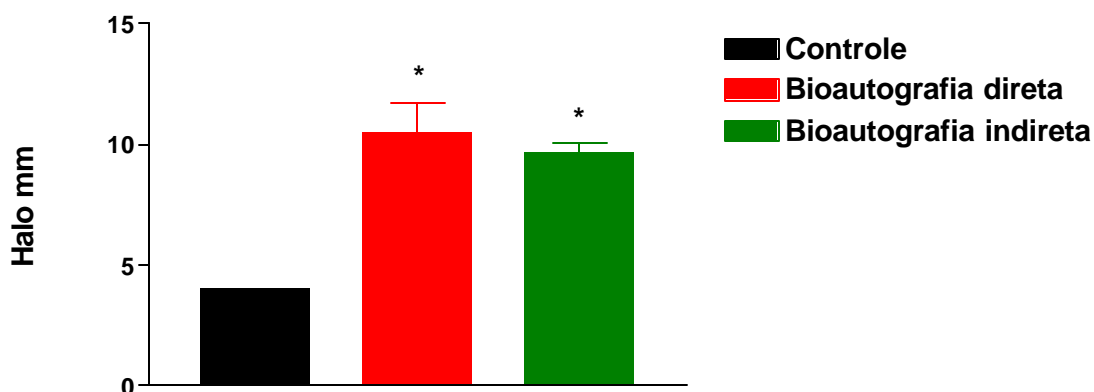
\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle.



**Figura 18** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso das substâncias puras testadas (100 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico GL(3,16);  $F=21,58$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.



**Figura 19** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* obtidas com o uso dos produtos naturais testados pelas duas variantes do método bioautográfico GL(3,60);  $F=31,76$ ;  $p<0.01$ .

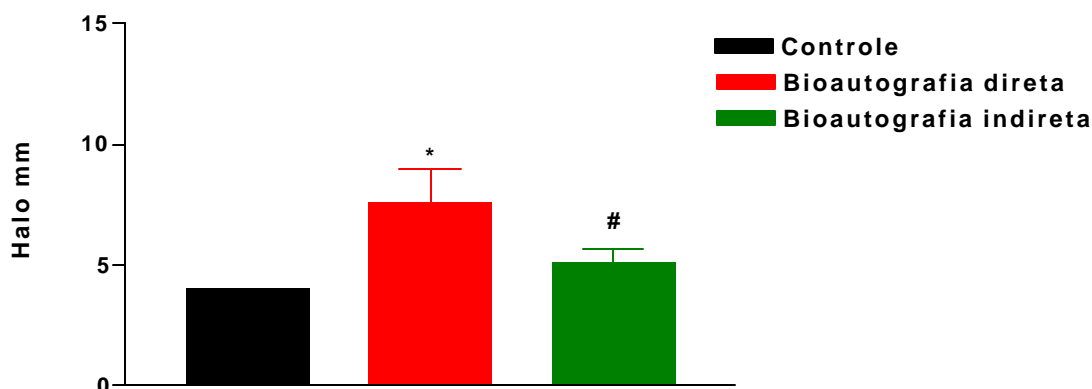
\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.

A comparação entre as duas variantes do método bioautográfico para a *E. coli* foi realizada apenas com extratos, devido às limitações na disponibilidade de frações e substâncias puras (Tabela 8). A comparação extrato por extrato foi realizada, uma vez que foram executadas repetições dos testes. Ao contrário do que foi observado nos testes contra *S. aureus*, neste caso verificou-se que existe diferença significativa [GL(18,19);  $F=13,95$ ;  $p<0.01$ ] na capacidade de determinar efeito antibacteriano das duas variantes do método bioautográfico. Dos nove



extratos usados nos testes, seis mostraram atividade contra *E. coli* com o uso da variante direta e apenas três foram ativos com o uso da variante indireta. Na figura 20 está representada a comparação realizada entre as médias dos diâmetros dos halos de inibição obtidas com o uso dos extratos testados pelas variantes do método bioautográfico contra *E. coli*.



**Figura 20** – Médias dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento da *Escherichia coli* obtidas com o uso dos extratos testados (400 µg) pelas duas variantes do método bioautográfico GL(3,32);  $F=4,90$ ;  $p<0.01$ .

\* Indica que a média obtida é diferente do diâmetro do controle;

# Indica que existe diferença significativa entre as médias dos diâmetros das zonas de inibição obtidas nas duas variantes do método de difusão empregadas.

Para sugerir critérios a serem adotados na avaliação do potencial antimicrobiano de produtos naturais determinado pelas duas variantes do método bioautográfico, 9 extratos, 2 frações e 5 substâncias puras foram testadas em concentrações que variaram de 12,5 a 400 µg contra as espécies bacterianas que mostraram sensibilidade no teste de triagem.

Até 1987, a maioria dos trabalhos publicados, onde os autores fizeram uso do método bioautográfico para detectar substâncias com propriedades antimicrobianas, foi baseada na variante indireta desse método (Hamburger e Cordell, 1987), pela qual o produto natural difunde da placa de CCD para o ágar. As zonas de inibição são então visualizadas pelo uso de corantes vitais apropriados (Betina, 1973). Segundo Lund e Lyon (1975), Hamburger e Cordell (1987) e Caccamase e colaboradores (1989), o procedimento de bioautografia

indireta é menos sensível que o ensaio de bioautografia direta devido à difusão diferencial de compostos do cromatograma para o ágar que ocorre apenas na variante indireta do método bioautográfico. Por outro lado, Rios e colaboradores (1988) recomendam a variante direta em detrimento da variante indireta do método de bioautografia. Os resultados da comparação da sensibilidade das duas variantes do método bioautográfico apresentados até aqui são mais favoráveis à sugestão de Rios e colaboradores (1988). Com os testes realizados com *S. aureus*, foi observado que, com exceção dos resultados obtidos com as substâncias puras, ambas as variantes demonstraram sensibilidades semelhantes para determinação da atividade antibacteriana, enquanto que para a *E. coli*, todos os resultados vão a favor da maior sensibilidade da variante direta.

Na tentativa de distinguir melhor a sensibilidade das variantes analisadas, foram realizadas diluições seriadas dos produtos naturais para serem testadas. Os resultados desses testes estão mostrados nas tabelas 9 e 10.

**Tabela 9** – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* obtidos nos testes bioautográficos, variante direta e variante indireta, com o uso de várias concentrações dos produtos naturais.

| Amostras   | Concentração (mg/ponto de aplicação) |     |     |     |     |    |    |    |     |     |      |     |
|--|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|-----|-----|------|-----|
|  | 400                                  |     | 200 |     | 100 |    | 50 |    | 25  |     | 12.5 |     |
|  | BD <sup>a</sup>                      | BI  | BD  | BI  | BD  | BI | BD | BI | BD  | BI  | BD   | BI  |
| <b><u>Extratos</u></b>   |                                      |     |     |     |     |    |    |    |     |     |      |     |
| <i>Baccharis ligustrina</i> (extrato etanólico)                | 10 <sup>b</sup>                      | 9   | 9   | 8   | 8   | 7  | 7  | 6  | _NT | _NT | _NT  | _NT |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato em clorofórmio)            | 8                                    | 6   | 8   | 6   | 8   | 5  | 5  | 0  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato etanólico)                 | 10                                   | 10  | 8   | 9   | 7   | 8  | 6  | 0  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> (extrato etanólico)          | 9                                    | 9   | 8   | 8   | 7   | 6  | 6  | 0  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Croton celtidifolius</i> (extrato etanólico)                | 9                                    | 11  | 6   | 10  | 0   | 9  | 0  | 8  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Cyathea phalerata</i> (extrato etanólico)                   | 7                                    | 9   | 6   | 8   | 5   | 6  | 0  | 0  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Eugenia jambolana</i> (extrato etanólico)                   | 6                                    | 10  | 0   | 7   | 0   | 5  | 0  | 0  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Eugenia uniflora</i> (extrato etanólico)                    | 7                                    | 11  | 6   | 8   | 0   | 7  | 0  | 6  | -   | -   | -    | -   |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato em clorofórmio)             | 8                                    | 7   | 8   | 7   | 6   | 6  | 5  | 5  | -   | -   | -    | -   |
| <b><u>Frações</u></b>  |                                      |     |     |     |     |    |    |    |     |     |      |     |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i> (fração em acetato de etila) | _NT                                  | _NT | 9   | 10  | 7   | 7  | 0  | 6  | 0   | 0   | _NT  | _NT |
| <i>Rottboelia cochinchinensis</i> (fração em hexano)           | -                                    | -   | 6   | 9   | 6   | 8  | 6  | 7  | 0   | 6   | -    | -   |
| <b><u>Substâncias puras</u></b>                                |                                      |     |     |     |     |    |    |    |     |     |      |     |
| Orselinato de butila   | _NT                                  | _NT | _NT | _NT | 17  | 12 | 15 | 12 | 14  | 11  | 12   | 11  |
| Orselinato de iso-propila                                      | -                                    | -   | -   | -   | 15  | 12 | 12 | 12 | 11  | 11  | 7    | 9   |
| Orselinato de metila   | -                                    | -   | -   | -   | 7   | 10 | 7  | 6  | 7   | 0   | 7    | 0   |
| Orselinato de pentila  | -                                    | -   | -   | -   | 22  | 11 | 20 | 11 | 16  | 11  | 13   | 10  |
| Orselinato de sec-butila                                       | -                                    | -   | -   | -   | 17  | 12 | 16 | 12 | 14  | 12  | 12   | 11  |

<sup>a</sup> BD = Variante direta do método bioautográfico; BI = Variante indireta do método bioautográfico.

<sup>b</sup> Valores expressos em milímetros.

<sup>NT</sup> Não testado.

**Tabela 10** – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento da bactéria *Escherichia coli* obtidos nos testes bioautográficos, variante direta e variante indireta, com o uso de várias concentrações dos extratos.

| Amostras  | Concentração (mg/ponto de aplicação) |    |     |    |     |    |    |    |
|---|--------------------------------------|----|-----|----|-----|----|----|----|
|   | 400                                  |    | 200 |    | 100 |    | 50 |    |
|   | BD <sup>a</sup>                      | BI | BD  | BI | BD  | BI | BD | BI |
| <i>Baccharis ligustrina</i> (extrato etanólico)       | 10 <sup>b</sup>                      | 8  | 8   | 6  | 6   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato em clorofórmio)   | 6                                    | 0  | 0   | 0  | 0   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Baccharis platypoda</i> (extrato etanólico)        | 10                                   | 0  | 8   | 0  | 6   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Baccharis pseudotenuifolia</i> (extrato etanólico) | 9                                    | 0  | 7   | 0  | 5   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Croton celtidifolius</i> (extrato etanólico)       | 10                                   | 0  | 8   | 0  | 7   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Cyathea phalerata</i> (extrato etanólico)          | 7                                    | 0  | 5   | 0  | 0   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Eugenia jambolana</i> (extrato etanólico)          | 6                                    | 7  | 0   | 0  | 0   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Eugenia uniflora</i> (extrato etanólico)           | 7                                    | 7  | 6   | 6  | 0   | 0  | 0  | 0  |
| <i>Ganoderma anularis</i> (extrato em clorofórmio)    | 7                                    | 0  | 5   | 0  | 0   | 0  | 0  | 0  |

<sup>a</sup> BD = Variante direta do método bioautográfico; BI = Variante indireta do método bioautográfico.

<sup>b</sup> Valores expressos em milímetros.

Os resultados apresentados na tabela 9 mostram que dos 16 produtos naturais com suas diluições seriadas testadas contra *S. aureus*, 31,2% foram favoráveis a maior sensibilidade da variante indireta, 25% foram favoráveis a maior sensibilidade da variante direta e em 43,8% dos casos, as duas variantes apresentaram sensibilidade semelhante. Para os testes realizados contra *E. coli* (Tabela 10), os resultados evidenciam que em 77,8% dos casos, a variante direta foi mais sensível que a variante indireta do método bioautográfico e, nos 22,2% restantes, a sensibilidade apresentada pelas duas variantes foi a mesma. De modo geral, parece que a variante direta do método de bioautografia possui uma maior capacidade para detectar atividade antibacteriana em concentrações menores dos produtos naturais, sendo, portanto, a variante mais sensível.

A determinação da concentração adequada dos produtos naturais a ser usada é importante para que os resultados obtidos por pesquisadores diferentes possam ser comparados e interpretados. Na literatura é muito variável a concentração usada dos extratos nos testes executados pelo método bioautográfico. Caccamese e colaboradores (1989) usaram 50 µg, enquanto Martini e Eloff (1998) usaram 500 µg. Benevides e colaboradores (2001), por sua vez, usaram concentrações dos extratos que variaram de 0,1 a 100 µg. Considerando as diferenças mencionadas acima, um outro objetivo do nosso trabalho foi sugerir a quantidade de extrato a ser usada nos testes. Para esta avaliação levou-se em conta apenas os dados das tabelas 9 e 10 referentes a variante direta do método bioautográfico. Dos 9 extratos ativos contra o *S. aureus* na concentração de 400 µg, 8 (88,9%) apresentaram inibição do crescimento dessa bactéria na concentração de 200 µg. Com relação à *E. coli*, dos 9 extratos ativos com o uso de 400 µg, 7 (77,8%) foram também ativos com o uso de 200 µg. Na concentração de 100 µg houve uma grande redução do número de extratos ativos. Na tabela 9, agora considerando as duas variantes do método bioautográfico, ainda pode ser observado que as duas frações testadas contra *S. aureus* foram ativas com o uso de 200 e 100 µg e que as substâncias puras mantiveram a atividade com o uso de 100 e 50 µg. O número de produtos naturais testados é insuficiente para definir valores para uso nos testes. Porém, é fácil

observar que os volumes usados nos testes foram suficientes para detectar a atividade desejada.

Mesmo que os resultados obtidos nesse estudo não tenham confirmado, com uma margem de segurança satisfatória, a maior sensibilidade da variante direta do método de bioautografia, ratificamos as sugestões de Rios e colaboradores (1988) e recomendamos o uso dessa variante para determinação da atividade antibacteriana de produtos naturais. Segundo Heneine (2000), o processo de difusão ocorre em meios gasosos, líquidos e até sólidos. Nos gases esse processo é rápido, nos líquidos é mais lento e nos sólidos pode durar séculos até que se note a migração das zonas mais concentradas para as menos concentradas. Sendo assim, sabemos que na variante direta a suspensão bacteriana é posta em contato com o produto natural na forma líquida (caldo nutritivo), já na variante indireta, a bactéria é misturada com o ágar ou semeada sobre o mesmo, o qual possui uma consistência semi-sólida. Esse argumento é suficiente para esperarmos que os diâmetros dos halos de inibição do crescimento sejam maiores na variante direta que na variante indireta para as mesmas concentrações dos produtos naturais. Além disso, o transporte do produto natural pelo caldo nutritivo tende a ser maior que aquele realizado pela água constituinte do ágar. Dessa forma, recomendamos que na escolha entre as variantes direta e indireta do método de bioautografia, seja feita a opção pela variante direta e que seja usada a concentração de 400 µg para os extratos.

Sob as condições usadas nos testes, em ambas as variantes do método bioautográfico, os resultados mostraram boa reprodutibilidade, o que demonstra uma boa precisão do método bioautográfico. Mesmo sabendo que o número de produtos naturais usados na realização desses testes foi menor que aquele usado na avaliação da precisão das variantes do método de difusão em ágar, e que os testes com as frações e substâncias puras não tenham sido realizados em duplicata, os resultados obtidos são satisfatórios, uma vez que os diâmetros dos halos encontrados nos testes de comparação entre *S. aureus* crescido por 24 h e 48 h, e aqueles encontrados na comparação da forma de estabelecer o contato da bactéria com os produtos naturais na variante indireta, também foram reprodutíveis. De qualquer forma, sugerimos que os testes sejam realizados em

outros laboratórios de pesquisa, pois, como já comentado anteriormente na discussão dos resultados dos testes de difusão, a precisão de um método é melhor avaliada quando os testes são feitos também por operadores diferentes de laboratórios diferentes.

Convém lembrar que anteriormente foi discutida a opção pela variante direta em função dos resultados obtidos. Porém, é importante colocar que ainda existem outros argumentos favoráveis ao uso da variante direta. Esse procedimento normalmente consome menos tempo para a sua execução que a variante indireta, principalmente se o número de produtos naturais a ser testado for grande e a realização do ensaio bioautográfico direto é mais simples que a realização da variante indireta desse método. Os custos de ambas as variantes do método bioautográfico avaliadas nesse estudo são similares.

Vanden Berghe e Vlietinck (1991) mencionaram que no método bioautográfico realizado pela variante indireta não há necessidade de usar amostras estéreis, já naquele realizado pela variante direta esse cuidado é necessário. Contrariamente a esses pesquisadores, consideramos importante adotar todos os procedimentos possíveis para diminuir o risco de contaminação. No nosso trabalho, as placas de CCD com os produtos naturais aplicados foram submetidas à exposição de lâmpada UV por 15 minutos antes de entrarem em contato com a suspensão bacteriana, na variante direta, ou com o ágar, na variante indireta. Técnicas assépticas e o uso de capela de fluxo laminar também são importantes em ambas as variantes.

No presente estudo, a atividade antibacteriana dos extratos e frações testadas pode representar a ação sinérgica dos elementos da mistura. Assim, se a placa de CCD for desenvolvida, talvez essa atividade antibacteriana seja diminuída. Porém, deve ser enfatizado que a possibilidade de realizar o teste a partir de cromatogramas torna a bioautografia uma ferramenta extremamente útil para a purificação da substância antibacteriana. Segundo Hamburger e Cordell (1987), a bioautografia permite a fácil localização de atividade em misturas complexas como aquelas derivadas de produtos naturais. Zonas de inibição bem definidas observadas diretamente na placa de CCD melhora a localização da substância ativa. A comparação com um cromatograma desenvolvido sob

condições idênticas e visualizado com um reagente cromogênico apropriado pode dar informações extremamente úteis sobre a natureza dos princípios ativos.

A bioautografia tem sido um método de detecção de atividade antibacteriana de produtos naturais muito valorizado pelos pesquisadores de laboratórios químicos. Nesses laboratórios, geralmente não existem os equipamentos microbiológicos apropriados para a realização de outros métodos, tais como o método de difusão apresentado neste trabalho, assim como os investigadores não estão habituados com técnicas microbiológicas necessárias para a realização do mesmo. Por esta razão, recomendamos que esse método continue sendo usado nessa situação. No presente trabalho não conseguimos comparar de forma satisfatória os métodos de difusão em ágar e bioautográfico, devido à disponibilidade pequena dos produtos naturais usados na realização deste último, no entanto, os resultados obtidos por esse procedimento (Tabelas 9 e 10) parecem ser compatíveis com aqueles obtidos pelo método de difusão em ágar (Tabelas 3 e 4). Assim, a opção por um dos dois métodos vai depender das condições de cada laboratório.

Na bioautografia, fases móveis contendo solventes de baixa volatilidade tal como n-butanol podem ser usadas, se eles forem removidos completamente antes do ensaio. No entanto, solventes muito ácidos ou básicos permanecem na placa de CCD após prolongado tempo de secagem e inibem o crescimento bacteriano (Hamburger e Cordell, 1987).

Vanden Berghe e Vlietinck (1991) relataram que o método bioautográfico, embora muito apropriado para testar antibióticos altamente ativos (valores de CIM pelo menos  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), mostrou não ser muito promissor para testar extratos de plantas, os quais freqüentemente contêm agentes antimicrobianos muito menos potentes que os antibióticos em uso. Segundo esses pesquisadores, o método bioautográfico detecta somente substâncias com alta potência, sendo um método de baixa sensibilidade. No entanto, se observarmos as sensibilidades apresentadas pelos métodos bioautográfico e de difusão, constata-se que o primeiro detectou atividade antibacteriana com o uso de concentrações dos extratos 10 vezes menores que aquela usada no método de difusão em ágar, sendo, portanto, o método mais sensível. Enquanto no método de difusão em



água são usados miligramas dos produtos naturais, no método bioautográfico usa-se microgramas desses produtos, como mostrado no presente trabalho. Hamburger e Cordell (1987) relataram que compostos sem ou com fraca atividade presentes em grande quantidade não interferem com a detecção de compostos com boa atividade, mas presentes em pequenas quantidades nos testes bioautográficos. Essa técnica para cromatografia em papel mostrou ser mais sensível que detecção nas placas de água (Csobán e Szabó, 1962).

Em diversas situações a quantidade de produto natural a ser usada nos testes é fundamental, pois como já foi comentado anteriormente, quando discutimos os resultados obtidos pelo método de difusão em água, os processos de obtenção de extratos, frações e substâncias puras são normalmente trabalhosos e demorados. Além disso, o rendimento da substância ativa muitas vezes é pequeno e a disponibilidade da fonte dessa substância na natureza é escassa em vários casos. O uso de métodos com alta sensibilidade auxilia no uso ético dos produtos naturais, evitando, dessa forma, desperdícios de recursos naturais. Nesse sentido, a utilização do método de bioautografia é uma ferramenta extremamente importante para que esse objetivo seja alcançado.

Vantagens do método bioautográfico são a pequena quantidade de amostra usada e a possibilidade de testar um número grande de compostos, o qual depende das dimensões da placa de CCD usada, contra uma espécie bacteriana.

O método bioautográfico pode ser realizado usando a técnica bidimensional, onde a placa de CCD é desenvolvida primeiramente com um sistema de solvente polar, em seguida esta é virada 90°C, e então desenvolvida uma segunda vez com um sistema solvente apolar. Essa técnica leva a vantagem de separar melhor misturas quimicamente complexas encontradas em extratos de produtos naturais, sendo mais apropriada que o ensaio unidimensional para separar substâncias lipofílicas de extratos obtidos de fontes naturais. Essa técnica elimina a necessidade do desenvolvimento de um grande número de placas em sistemas de solventes múltiplos, reduz a quantidade gasta de solventes, e reduz o tempo necessário para identificar compostos ativos (Wedge e Nagle, 2000).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi possível considerar que:

- ❖ Dos 55 produtos naturais testados, 35 inibiram o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* (63,6%) e 11 inibiram o crescimento da bactéria *Escherichia coli* (20%), demonstrando que o efeito contra a espécie Gram-positiva foi mais pronunciado que aquele em relação à espécie Gram-negativa;
- ❖ O método de difusão variante poço mostrou ser mais sensível que o método de difusão variante disco. Da mesma forma, os resultados obtidos indicam que a variante direta do método bioautográfico apresenta maior sensibilidade que a variante indireta desse método;
- ❖ O método bioautográfico foi mais sensível que o método de difusão, entretanto, a opção por um dos métodos dependerá das condições de cada laboratório. Sugerimos que laboratórios com melhor infra-estrutura para métodos microbiológicos usem o método de difusão e aqueles mais voltados para química de produtos naturais usem o método bioautográfico;
- ❖ Considerando as limitações do presente estudo, podemos afirmar que as duas variantes do método de difusão em ágar e as duas variantes do método bioautográfico apresentam boa precisão, pois os halos de inibição do crescimento das duas espécies bacterianas usadas foram similares nas repetições realizadas nos testes. De qualquer forma, sugerimos que os testes sejam realizados em outros laboratórios de pesquisa, pois a precisão de um método é melhor avaliada quando os testes são feitos também por operadores diferentes de laboratórios diferentes;
- ❖ Na execução do método de difusão recomendamos que sejam usadas as seguintes quantidades: extratos – 4 mg, frações – 3 mg e substâncias puras - 0,5 mg. Para o método bioautográfico, sugerimos o uso de 400 µg para a realização dos testes com extratos;
- ❖ Outros fatores que incentivam o uso da variante com poço e desestimulam o uso da variante com discos são: o pequeno tempo consumido na 1ª variante, a maior simplicidade da 1ª variante, a possibilidade de usar volumes maiores

(concentrações menores dos produtos naturais) na variante poço, a interferência do papel filtro na 2ª variante, o possível transporte do produto natural pelo solvente na variante poço contra a provável movimentação por capilaridade na variante disco;

- ❖ O preparo do inóculo bacteriano a partir de cultivo de 24 e não 48 horas é adequado para a realização dos testes pelo método bioautográfico e o uso da concentração de 0,2 mg/mL da solução reveladora de sal de *p*-iodonitrotetrazolium violeta é suficiente para permitir a leitura dos resultados. A adoção desses dois procedimentos resulta na economia de tempo e recursos, uma vez que o custo do sal de tetrazólio é elevado;
- ❖ Na variante indireta do método de bioautografia, tanto a inoculação da suspensão bacteriana com o auxílio de “swab” quanto a mistura da mesma no ágar, podem ser usadas para estabelecer o contato da suspensão bacteriana com o produto natural.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZU, B. *et al.* Effect of *Zizuphus spina-christi* Willd aqueous extract on the central nervous system in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 13-16, 2002
- AFOLAYAN, A. J. and MEYER, J. J. M. The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **57**, p. 177-181, 1997
- AHMAD, A. *et al.* Evaluation of hepatoprotective potencial of jigrine post-treatment against thioacetamide induced hepatic damage. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 35-41, 2002
- AHMAD, I. and BEG, A. Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **74**, p. 113-123, 2001
- AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. *HerbalGram*, v. **28**, p. 13-19, 1993
- AKIHISA, T. *et al.* Triterpenealcohols from the flowers of compositae and their anti-inflammatory effects. *Phytochemistry*, v. **43**, p. 1255-1260, 1996
- ALEXOPOULOS, C. J. *et al.* **Introductory mycology**. M. 4<sup>th</sup> ed. Blackwell, 1996
- ALI, N.A.A. *et al.* Screening of Yemeni medicinal plants for antibacterial and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **74**, p. 173-179, 2001
- ALVES, P.L. DE C.A.; PAVANI, M.C.M.D. **Instruções básicas para a coleta e preparo de material botânico a ser herborizado**. Jaboticabal: FUNEP, 1991
- ALVES, T.M.A. *et al.* Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*. *Planta Medica*, v. **63**, n. 6, p. 554-555, 1997
- ANDRADE-CETTO, A. and WIEDENFELD, H. Hypoglycemic effect of *Cecropia obtusifolia* on streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 145-149, 2001
- ANILA, L. and VIJAYALAKSHMI, N. R. Flavonoids from *Embllica officinalis* and *Mangifera indica*– effectiveness for dyslipidemia. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 81-87, 2002
- AOKI, T. Antibodies to HTLV I and HTLV II in sera from two Japanese patients, one with possible pre-AIDS. *Lancet*, v. **20**, p. 936-937, 1984
- AZEVEDO, J. L. **Genética de microrganismos**. Goiânia: Editora da UFG, 1998, 490 p

- BABU, B. H.; SHYLES, B. S.; PADIKKALA, J. Tumour reducing and anticarcinogenic activity of *Acanthus ilicifolius* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 27-33, 2002
- BABU, J. R. Avermectins: biological and pesticidal actions. In: CURLER, H. G. (Ed.). **Biologically Active Natural Products**, ACS, Washington, DC, EUA, 1988, p. 91-108
- BARREIRO, E. J. & FRAGA, C. A. M. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001
- BASNET, P. *et al.* Bellidifolin: a potent hypoglycemic agent in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats from *Swertia japonica*. *Planta Medica*, v. **60**, p. 507-511, 1994
- BEGHE, W. J. and KLINE, R. M. The use of tetrazolium salts in bioautography procedures. *Journal of Chromatography*, v. **64**, p. 182-184, 1972
- BENEVIDES, P.J.C. *et al.* Antifungal polysulphides from *Petiveria alliacea* L. *Phytochemistry*, v. **57**, p. 743-747, 2001
- BETINA, V. Bioautography in paper and thin-layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *Journal of Chromatography*, v. **78**, p. 41-51, 1973
- BINDSEIL, K. U. *et al.* Pure compound libraries; a new perspective for natural product based drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. **6**, n. 16, p. 840-847, 2001
- BINUTU, O.A.; ADESOGAN, K.E.; OKOGUN, J.I. Antibacterial and antifungal compounds from *Kigelia pinnata*. *Planta Medica*, v. **62**, p. 352-353, 1996
- BISIGNANO, G. *et al.* In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*, v. **198**, p. 9-13, 2001
- BLUMENTHAL, M. Herb industry sees mergers, acquisitions, and entry by pharmaceutical giants in 1998. *HerbalGram*, v. **45**, p. 67-68, 1999
- BOBEK, P.; GALBAVY, S.; OZDIN, L. Effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) on pathological changes in dimethylhydrazine induced rat colon cancer. *Oncol Rep*, v. **5**, n. 3, p. 727-730, 1998a
- BOBEK, P.; OZDIN, L.; GALBAVY, S. Dose and time dependent hypocholesterolemic effect of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) in rats. *Nutrition*, v. **14**, n. 3, p. 282-286, 1998b
- BORRIS, R. P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **51**, p. 29-38, 1996
- BRABBAN, A.D. and EDWARDS, C. The effects of glucosinolates and their hydrolysis products on microbial growth. *Journal Applied Bacteriology*, v. **79**, n.2, p. 171-177, 1995

BRAITHWAITE, A. and SMITH, F. *Journal of Chromatographic methods*. Chapman and Hall, London, 1990

BRANTNER, A. *et al.* Antimicrobial activity of *Paliurus spina-christi* mill. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **52**, p. 119-122, 1996

BRANTNER, A.; PFEIFFER, K. P.; BRANTNER, H. Applicability of diffusion methods requerids by the pharmacopoeias for testing antibacterial activity of natural compounds. *Pharmazie*, v. **49**, p. 512-516, 1994

BURAPADAJA, S.; BUNCHOO, A. Antimicrobial activity of tannins from *Terminalia citrina*. *Planta Medica*, v. **61**, p. 365-366, 1995

CACCAMESE, S.; CASCIO, O.; COMPAGNINI, A. Isolation of an antimicrobial bromoditerpene from a marine alga aided by improved bioautography. *Journal of Chromatography*, v. **478**, p. 255-258, 1989

CACERES, A. *et al.* Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram -positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **31**, p. 193-208, 1991

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Research*, v. **33**, p. 179-189, 2000

CASELL, G. H. and MEKALANOS, J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *Journal of the American Medical Association*, v. **285**, n. 5, p. 601-605, 2001

COLEY, P. D. Effects of leaf age and plant life history patterns on herbivory. *Nature*, v. **284**, p. 545-546, 1980

CRAGG, G. M. *et al.* Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v. **60**, p. 52-60, 1997

CSOBAN, G. and SZABÓ, G. *Kisérl. Orvestud.*, 1962. I.

DE SMET, P. A. G. M. The role of plant-derived drugs and herbal medicines in healthcare. *Drugs*, v. **54**, p. 801-840, 1997

DEY, P.M. and HARBORNE, J.B. (Ed.). **Methods in plant biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1991, v. 6

DHAWAN, K.; KUMAR, S.; SHARMA, A. Anti-anxiety studies on extracts of *Passiflora incarnata* Linneaus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 165-170, 2001

DI STASI, L. C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. 230 p.

- DIGRANES, A. and MELBY, K. K. Susceptibility testing of bacteria and fungi. Report from the 'Norwegian working group on antibiotics'. *Scandinavian Journal Infectious Diseases*, Suppl. **103**, 1997
- DUDKA, I. A. and WASSER, S. P. Reference book of a mycologist and mushroomers. Kiev, Nauk. Dumka. 536p., 1987
- ELOFF, J. N. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. Subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **76**, p. 305-308, 2001
- FALCH, B. S. *et al.* Biological activities of Cyanobacteria: evaluation of extracts and pure compounds. *Planta Medica*, v. **61**, p. 321-328, 1995
- FARIAS, M. R. *et al.* Espécies vegetais empregadas na produção de fitoterápicos em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1994, Fortaleza. *Anais...* Fortaleza, 1994. p.125
- FARNSWORTH, N. R. **Ethnobotany and the search for new drug**. Wiley, 1994
- FAVIER, M.L. *et al.* Fermentable carbohydrates exert a more potent cholesterol-lowering effect than cholestyramine. *Biochim. Biophys. Acta*, n. 1258, p. 115-121, 1995.
- FERNANDES, M. A.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T. Antibacterial activity of the phenolics acids fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **53**, p. 11-14, 1996
- FLAYEH, K. A., and SULAYMAN, K. D. Antimicrobial activity of the amine fraction of cucumber (*Cucumis sativus*) extract. *Journal of the Applied Microbiology*, v. **3**, p. 275-279, 1987
- FOLHA de São Paulo. **A guerra dos remédios**. P.2-1, 17.2.1997.
- FREIBURGHHAUS, F. *et al.* Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **55**, p. 1-11, 1996
- GALATI, E. M. *et al.* Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter. Note I: diuretic activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 17-21, 2002
- GOODALL, R. R. and LEVI, A. A. *Nature* (London), v. **158**, p. 675, 1946
- GRABLEY, S. and THIERICKE, R. The impact the natural products on drug discovery. In: Grabley, S. and Thiericke, R. (Ed.). **Drug Discovery from Nature**, pp. 3-37, Springer, 1999
- GRABLEY, S. *et al.* The chemical screening approach. In: GRABLEY, S. and THIERICKE, R. (Ed.). **Drug Discovery from Nature**, pp. 124-148, Springer, 1999
- GROSVENOR, P. W.; SUPRIONO, A.; GRAY, D. O. Medicinal plants from Riau province, Sumatra, Indonésia. Part 2, Antibacterial and antifungal activity. *Journal*

of *Ethnopharmacology*, v. **45**, p. 97-111, 1995

GRUNWALD, J. The european phytomedicines market figures, trends, analyses. *HerbalGram*, v. **34**, p. 60-65, 1995

GUGLIUCCI, A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. **224**, p.338-344, 1996

HAMBURGER, M.O.; CORDELL, G.A. A direct bioautographic TLC assay for compounds possessing antibacterial activity. *Journal of Natural Products*, v. **50**, n.1, p. 19-22, 1987

HANCOCK, R.E.W. The role of fundamental research and biotechnology in finding solutions to the global problem of antibiotic resistance. *Clinical Infectious Diseases*, **24** (Suppl 1), S148-S150, 1997

HARRIS, F.; CHATFIELD, L.; PHOENIX, D. Antibiotics: the bacterial resistance movement sunken back. *Biologist*, v. **42**, p. 62-64, 1995

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*, v. **5**, p. 294-300, 2000

HAWKSWORTH, D.L. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycology Research*, v. **95**, n. 6, p. 641-655, 1991

HAWKSWORTH, D. L. *et al.* Ainsworth & Bisbi's Dictionary of the Fungi 8<sup>th</sup> ed. CAB International, University Press, Cambridge. 616p., 1995

HECHT, S. M. In: Cancer Chemotherapeutic Agents, FOYE, W. O. (Ed.), ACS, Washington, DC, EUA, 1995, pp. 369-388

HENEINE, I. F. **Biofísica básica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2000

HENKEL, T. *et al.* Statistical investigation into the structural complementarity of natural products and synthetic compounds. *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* v. **38**, p. 643-647, 1999

HOBBS, C. **Medicinal mushrooms: an exploration of tradition, healing and culture**. Santa Cruz: Botanica Press, CA. 251p., 1995

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. *Planta Medica.*, v. **63**, p. 2-10, 1997

HUFFORD, C. D. *et al.* Antimicrobial compounds from *Peralostemum purpureum*. *Journal of Natural Products*, v. **56**, p. 1878-1889, 1993

HUTCHINSON, C. R. and FUJII, I. *Annual Review of Microbiology*, v. **49**, p. 201-238, 1995



IEVEN, M. *et al.* Screening of higher plants for biological activity. *Planta Medica*, v. **36**, p. 311-321, 1979

INSTITUTE of Medicinal Statistics (IMS). **Mercado farmacêutico brasileiro, vendas**, 1992.

IWU, M. M. *et al.* Antibacterial aromatic isothiocyanates from the essential oil of *Hippocratea welwitschii* roots. *International Journal of Pharmacognosy*, v. **29**, p. 154-158, 1991

JANSSEN, A. M.; SCHEFFER, J. J. C.; BAERHEIM SVENDSEN, A. In: BRUNKE, L. J. (Ed.). **Progress in essential oil research**, pp. 401-419. Walter de Gruyter, Berlin, 1986

JEONG, T.C. *et al.* Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in sprague dawley rats. *Planta Medica*, v. **63**, n. 2, p. 136-140, 1997

KEAWPRDUB, N. *et al.* Activity of extracts and alkaloids of Thai *Alstonia* species against human lung cancer cell lines. *Planta Medica*, v. **63**, n. 2, p. 97-101, 1997

KELLY, R.A. and SMITH, W.T. Tratamento farmacológico da insuficiência cardíaca. In: GILMAN, A.G. *et al.* (Ed.). **Goodman e Gilman as bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana, 1996. Cap. 34, p. 595-615

KIRIMER, N. *et al.* Antispasmodic and spasmogenic effects of *Scolymus hispanicus* and taraxasteryl acetate on isolated ileum preparation. *Planta Medica*, v. **63**, n. 6, p. 556-557, 1997

KNOWLES, D.J.C. New strategies for antibacterial drug design. *Trends Microbiol.* v. **5**, n. 10, p. 379-383, 1997

KURASHIGE, S.; AKUZAWA, Y.; ENDO, F. Effects of *Lentinus edodes*, *Grifola frondosa* and *Pleurotus ostreatus* administration on cancer outbreak and activities of macrophages and lymphocytes in mice treated with a carcinogen, N-butyl N-butanolnitrosamine. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, v. **19**, n. 2, p. 175-183, 1997

LAHANA, R. How many leads from HTS? *Drug Discovery Today*, v. **4**, p. 447-448, 1999

LAWRENCE, R. N. Rediscovering natural product biodiversity. *Drug Discovery Today*, v. **4**, p. 449-451, 1999

LECLERC, R. Enterococci acquire new kinds of resistance. *Clinical Infectious Disease*, v. **24** (Suppl 1), p. 80-83, 1997

LE MOS, T. L. G. *et al.* Anti microbial activity of essential oils of brazilian plants. *Phytotherapy research*, v. **4**, p. 82-84, 1990

LEVY, S.B. The challenge of antibiotic resistance. *Scientific American*, v. **278**, n. 3, p. 32-39, 1998

LEVY, S. B. Antibiotic resistance: consequences of inaction. *Clinical Infectious Diseases*, v. **33** (Suppl 3), p. 124-129, 2001

LIN, J.; PUCKREE, T.; MVELASE, T. P. Anti-diarrhoeal evaluation of some medicinal plants used by Zulu traditional healers. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 53-56, 2002

LINTON, A. H. In: RUSSEL, A. D. and QUESNEL, L. B. (Ed.). **Antibiotics: assessment of antimicrobial activity and resistance**, pp. 19-30, Academic Press, London, 1983

LIU, G-T. Recent advances in research of pharmacology and clinical applications of *Ganoderma* P. Karst. Species (Aphyllphoromycetideae) in China. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. **1**, p. 63-67, 1999

LUCAS, E. H. *et al.* Tumor inhibitors in *Boletus edulis* and other Holobasidiomycetes. *Antibiotic Chemotherapy*, v. **7**, p. 1-4, 1957

LUMMIS, S. C. R. *et al.*  $\gamma$ -aminobutyric acid-modulate benzodiazepine binding-sites in bacteria. *Life Sciences*, v. **49**, p. 1079-1086, 1991

LUND, B. M. and LYON, G. D. *Journal of Chromatography*, v. **110**, p. 193-196, 1975

MACKEEN, M.M. *et al.* Antibacterial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. Ex T. Anders. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **72**, p. 395-402, 2000

MAHMOUD, M. R.; EL-ABHAR, H. S.; SALEH, S. The effect of *Nigella sativa* oil against the liver damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 1-11, 2002

MAJEED, M. Diabetes. Its etiology and control with ayurvedic herbs. Preliminary report. Sabinsa corporation, 28 p., 1998

MAKARE, N.; BODHANKAR, S.; RANGARI, V. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 133-137, 2001

MARTINI, N. and ELOFF, J. N. The preliminary isolation of several antibacterial compounds from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. **62**, p. 255-263, 1998

McCABE, W. R. and TREADWELL, T. L. In-vitro susceptibility tests; correlations between sensitivity testing and clinical outcome in infected patients. In. LORIAN, C. (Ed.), **Antibiotics and Laboratory Medicine**. Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 925-937, 1986

- MIZUNO, T. Food function and medicinal effect of mushrooms fungi. *Foods Food Inged. J.* (Japan), n. **158**, p. 55-70, 1993
- MIZUNO, T. Bioactive biomolecules of mushrooms: food function and medicinal effect of mushrooms fungi. *Food Rev Intern*, v. **11**, n. 1, p. 7-21, 1995a
- MIZUNO, T. Yamabushitake, *Hericium erinaceum*: biactive substances and medicinal utilization. *Food Rev Intern*, v. **11**, n. 1, p. 173-178, 1995b
- MIZUNO, T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. *Food Food Inged. J.* (Japan), v. **167**, p. 69-85, 1996
- MIZUNO, T. "Antitumor mushrooms" – *Ganoderma lucidum*, *Grifora frondosa*, *Letinus edodes*, and *Agaricus blazei*. Gendai-shorin, Tokyo. 188p., 1997
- MIZUNO, T. "Immunologycal special diets" – *Agaricus blazei*, *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis*, *Grifora frondosa*, and *Letinus edodes*. Gendai-shorin, Tokyo. 188p., 1998a
- MIZUNO, T. Bioactive substances in Yamabushitake: the *Hericium erinaceum* fungus, and its medicinal utilization. *Foods Food Inged. J.* (Japan), v. **167**, p. 69-85, 1998b
- MIZUNO, T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan ( Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. **1**, p. 9-29, 1999
- MIZUNO, T.; SAKAI, H.; CHIHARA, G. Health foods and medicinal usages of mushrooms. *Food Rev. Intern*, v. **11**, n. 1, p. 69-82, 1995
- MOERMAN, D.E. The medicinal flora of native North America: an analysis. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **31**, p. 1-42, 1991
- MURAKAMI, A. *et al*. Bitter cyanoglucosides from *Lophira alata*. *Phytochemistry*, v. **32**, p. 1461-1466, 1993
- MURRAY, P. R. *et al*. **Manual of clinical microbiology**. 7<sup>th</sup> ed., Washington, DC, American Society for Microbiology, 1999
- MYERS, P. L. Will combinatorial chemistry deliver real medicines? *Current Opinion in Biotechnology*, v. **8**, p. 701-707, 1997
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. NCCLS document M100-S3, Villanova, PA, 1991
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests (5<sup>th</sup> edition). Approved standard. NCCLS document M2-A5, Villanova, 1993
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Fifth informational

supplement document M100-S5, v. 14, n. 16. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 1994

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS.

Development of in-vitro susceptibility testing criteria and quality control parameters for veterinary antimicrobial agents. Approved guidelines. NCCLS document M37-A, 37-A, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, 1999

NIMRI, L. F.; MEQDAM, M. M.; ALKOFABI, A. Antibacterial activity of Jordanian medicinal plants. *Pharmaceutical Biology*, v. **37**, p. 196-201, 1999

NODA-SHOKUKIN. A preparation for kidney treatment possessing antiinflammatory activity, obtained from Basidiomycetes, e.g. *Lentinus*, *Pleurotus*, *Flammulia*, and *Tricholoma*. Patent JPJ 61171428 (1986), JP 85-11888 (1985), 1998a

NODA-SHOKUKIN. Preparation of an antiviral agent by deep culture of Basidiomycetes. Patent, JP 60054324, JP 83162084, 1998c

NOSTRO, A. *et al.* Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Letters in Applied Microbiology*, v. **30**, p. 379-384, 2000

OJALA, T. *et al.* Antibacterial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **73**, p. 299-305, 2000

OKEKE, M. I. *et al.* Evaluation of extracts of the root of *Landolphia owerrience* for antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 119-127, 2001

OKPO, S. O.; FATOKUN, F.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 207-211, 2001

OLIVEIRA, B. M. *et al.* Speciation of cone snails and interspecific hyperdivergence of their venom peptides potential – evolutionary significance of introns. *Ann. New York Acad. Sci.*, v. **870**, p. 223-237, 1999

ONAWUNMI, G. O.; YISAK, W.; OGUNLANA, E. O. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **12**, p. 279-286, 1984

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. New York: Oxford University Press, 1995

PETERS, R.R.; FARIAS, M.R.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Anti-inflammatory and analgesic effects of cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata*. *Planta Medica*, v. **63**, n. 6, p. 525-528, 1997

PIDDOCK, L. Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* v. **68**, p. 307-318, 1990

PIMM, S. L. *et al.* The future of biodiversity. *Science*, v. **269**, p. 347-350, 1995

PLOTKIN, M.J. Traditional knowledge of medicinal plants: the search for new

jungle medicines. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. **Conservation of medicinal plants**. Cambridge: Cambridge University Press., 1991, p. 53-64

PRATT, W.B. *et al.* **The anticancer drugs**. 2 ed. New York: Oxford University, 1994, p. 183-198

RIOS, J. L., RECIO, M. C.; VILLER, A. Screening as methods for natural products with antimicrobial activity: Review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **23**, p. 127-149, 1988

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. **Farmacognosia e farmacobioteecnologia**. 1. ed. em Português. Editorial Premier, 1997. 372 p.

ROCHA E SILVA, M. **Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica**. 3. ed. rev., São Paulo: EDART; Brasília: INL, 1973. v.1

SÁNCHEZ-MATEO, C. C.; PRADO, B.; RABANAL, R. M. Antidepressant effects of the methanol extract of several *Hypericum* species from the Canary Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 119-127, 2002

SARKAR, S. *et al.* Antiviral effect of the extract of culture medium of *Lentinus edodes* mycelia on the replication of herpes simplex virus type 1. *Antiviral Research*, v. **20**, n. 4, p. 293-303, 1993

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry*, v. **30**, p. 3875-3883, 1991

SCHILCHER, H. Effects and side-effects of essential oils. In: SVENDSEN, A.B.; SCHEFFER, J.J.C. (Ed.). **Essential oils and aromatic plants**. Dordrech: W.J. Publishers, 1985

SILVA, C.H.P.M. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis, RJ: Eventos, 1999

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. rev. Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2000, 821p.

SINGH, S.; REHAN, H. M. S.; MAJUMDAR, D. K. Effect of *Ocimum sanctum* fixed oil on blood pressure, blood clotting time and pentobarbitone-induced sleeping time. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 139-143, 2001

SMÂNIA, A. Jr. *et al.* Antibacterial activity of a substance produced by the fungus *Pycnoporus sanguineus* (Fr) Murr. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **45**, p. 177-181, 1995

SMITH, P. Accuracy, precision and meaning of antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases (review). *Aquaculture*, v. **196**, p. 253-266, 2001

SMITH, P.; HINEY, M. P.; SAMUELSEN, O. B. Bacterial resistance to antimicrobial agents used in fish farming: a critical evaluation of method and meaning. *Ann. Rev. Fish Dis.*, v. **4**, p. 273-313, 1994

- STEFANOVICH, V. The xanthines. *Drug News Perspec.*, v. **2**, n. 2, p. 82-88, 1989
- STROHL, W. R. The role of natural products in a modern drug discovery program. *Drug Discovery Today*, v. **5**, p. 39-41, 2000
- SULTANOVA, N. *et al.* Antioxidant and antimicrobial activities of *Tamarix ramosissima*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 201-205, 2001
- SUN, H. D. *et al.* Nigranoic acid, a triterpenoid from *Schisandra sphaerandra* that inhibits HIV-1 reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*, v. **59**, p. 525-527, 1996
- SURESH, B. *et al.* Anticandidal activity of *Santolina chamaecyparissus* volatile oil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **55**, p. 151-159, 1997
- TADA, M. *et al.* Nematicidal and antimicrobial constituents from *Allium grayi* Regel and *Allium fistulosum* L. var. *caespitosum*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 52, p. 2383-2385, 1988
- TAKATSU, M. *et al.* Anticancer substances produced by Basidiomycetes. Patent, JP 50012293 750207 Showa, Japan Kokkai, 3pp., 1998
- TAVARES, W. Manual de antibióticos: para o estudante de medicina. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1984, 374 p.
- TRUTE, A. *et al.* In vitro antispasmodic compounds of the dry extract obtained from *Hedera helix*. *Planta Medica*, v. **63**, n. 2, p. 125-129, 1997
- VANDEN BERGHE, D.A.; VLIETINCK, A.J. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In DEY, P. M. and HARBONE, J. B. **Methods in Plant Biochemistry**, p. 47-69, London: Academic Press, 1991
- VATS, V.; GROVER, J. K.; RATHI, S. S. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 95-100, 2002
- VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, v. **3**, p. 232-238, 1998
- VIJAYA, K.; ANANTHAN, S.; NALINI, R. Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.---a cell culture study. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **49**, p. 115-118, 1995
- WAN, J.; WILCOCK, A.; COVENTRY, M. J. The effect of essential oils of basil on the growth of *Aeromonas hydrophila* and *Pseudomonas fluorescens*. *Journal Applied Microbiology*, v. **84**, p. 152-158, 1998
- WASHINGTON, J. A. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, v. **9**, p. 135-138, 1988
- WASSER, S. P. The fungus among us. *Eretz Magazine*, p. 52-55, 1997

- WASSER, S. P. and WEIS A. L. Medicinal mushrooms. Reishi mushroom (*Ganoderma lucidum* (Curtis:Fr.) P. Karst.), Nevo E., ed., Peledfus, Haifa. 39p., 1997a
- WASSER, S. P. and WEIS A. L. Medicinal mushrooms. *Lentinus edodes* (Berk.) Sing. (Shiitake mushroom), Nevo E., ed., Peledfus, Haifa. 96p., 1997b
- WASSER, S. P. and WEIS A. L. Therapeutic effects of substances occurring in higher Basidiomycetes mushrooms: a modern perspective. *Critical Review in Immunology*, v. **19**, p. 65-96, 1999a
- WASSER, S. P.; WEIS, A. L.. Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives ( Review). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, v. **1**, p. 31-62, 1999b
- WASSON, R. G. S. **The divine mushroom of immortality**. Harcourt Brace Jovanovich, New York. 251p., 1968
- WEDGE, D. E. and NAGLE, D. G. A new 2D-TLC bioautography method for the discovery of novel antifungal agents to control plant pathogens. *Journal of Natural Products*, v. **63**, p. 1050-1054, 2000
- WELAC WORKING GROUP. Accreditation for chemical laboratories: guidance on the interpretation of the EN45000 series of standards and ISO/IEC guide 25. Welac Eurochem Guidance Doc. No. 1. Addition 1. April 1993, 1993
- WENIGER, B. *et al.* Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **78**, p. 193-200, 2001
- XU, H. X. *et al.* Anti-HIV triterpene acids from *Geum japonicum*. *Journal of Natural Products*, v. **59**, p. 643-645, 1996
- YANG, Q. Y. and Jong, S. C. Medicinal mushrooms in China. *Mushr Sci*, v. **9**, n. 1, p. 631-643, 1989
- YAO, Q. Z. *et al.* Isolation and characterization of a Type I ribosome-inactivating protein from fruiting bodies of the edible mushroom (*Volvariella volvacea*). *J. Agri. Food Chem.*, v. **46**, p. 788-792, 1998
- YFF, B. T. S. *et al.* The pharmacological screening of *Pentanesia prunelloides* and the isolation of the antibacterial compound palmitic acid. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 101-107, 2002
- YING, J. *et al.* **Icones of medicinal fungi from China**, Yuehan X, trans. Science Press, Beijing. 1987, 575p.
- ZAOU, A. *et al.* Effects of *Nigella sativa* fixed oil on blood homeostasis in rat. *Journal of Ethnopharmacology*, v. **79**, p. 23-26, 2002
- ZHANG, Y. and LEWIS, K. Fabinins: new antimicrobial plant peptides. *FEMS Microbiol. Lett.* v. 149, p. 59-64, 1997